

**Untersuchungen zur Modulation intestinaler epithelialer
Wundheilungsvorgänge *in vitro* durch Adeninnukleotide und
Bestandteile der extrazellulären Matrix**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität GH Essen

vorgelegt von
Andrea Becker
aus Essen

April 1999

- | | |
|---------------|----------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. H. Esche |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. H. Grunz |
| 3. Gutachter: | Prof. Dr. H. Goebell |

Tag der mündlichen Prüfung: 30. September 1999

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A ₁	Adenosinrezeptor Typ 1
A _{260nm}	Absorption bei 260 nm
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATP _γ S	Adenosin-gamma-S
β _γ Me-ATP	beta-gamma-Methylenadenosintriphosphat
Bp	Baasenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklische Adenosinmonophosphat
cDNA	"komplementäre" DNA
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
cpm	counts per minute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Activated Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IEC-6	Intestinal Epithelial Cell line 6
IFN _γ	Interferon-gamma
IGF	Insulin-like Growth Factor
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LTBP	latentes TGFβ Bindungsprotein
MAP-Kinase	Mitogen Activated Protein Kinase
MeSATP	2-Methylthioadenosintriphosphat
mRNA	"messenger" RNA
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
μCi	Mikrocurie (3,7 x 10 ⁷ Zerfälle pro Sekunde)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
P1	Purinrezeptor Typ 1
P2	Purinrezeptor Typ 2
P2x	Purinrezeptorsubtyp "x"

P2y	Purinrezeptorsubtyp "y"
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Standard-Natriumcitrat
TGF α	Transforming Growth Factor α
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
UTP	Uridintriphosphat

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das intestinale Epithel	1
1.2	Die intestinale epitheliale Wundheilung	3
1.3	Adeninnukleotide und Purinrezeptoren	6
1.4	Die intestinale Basalmembran und ihre Bestandteile	8
1.5	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien	12
2.1.2	Glas- und Plastikmaterialien	15
2.1.3	Membranen und Filmmaterialien	15
2.1.4	Puffer und Lösungen	15
2.1.6	Zelllinien	20
2.1.7	Bakterienstämme und Vektoren	20
2.1.8	Gensonden	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellkultur	22
2.2.2	Untersuchung der Zellkulturen auf Mycoplasmen	22
2.2.3	<i>In vitro</i> Wundheilungsmodell	23
2.2.4	<i>In vitro</i> Migrationsmodell	24
2.2.5	Mitomycin-Vorbehandlung	25
2.2.6	Bestimmung der intestinalen epithelialen Zellproliferation <i>in vitro</i>	25
2.2.7	Bestimmung von aktivem und latentem Transforming Growth Factor β (TGF β) in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen	26
2.2.8	Untersuchung der Adhäsion von IEC-6 Zellen mit Hilfe eines Enzym-Adhäsionsassay (Hexosaminidase-Adhäsionsassay)	28
2.2.9	Beschichtung von Zellkulturschalen mit extrazellulären Matrixfaktoren	28
2.2.10	Untersuchungen zur Vitalität von IEC-6 Zellen	29
2.2.11	Bakterienkultur	29
2.2.12	Midipräparation von Plasmid-DNA	29
2.2.13	DNA-Restriktion	30
2.2.14	Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen	30
2.2.15	Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	30
2.2.16	Radioaktive Markierung von cDNA	31
2.2.17	Isolation von Gesamt-RNA aus intestinalen Epithelzellen	32
2.2.18	Gewinnung von mRNA aus Gesamt-RNA	32
2.2.19	Auftrennung von RNA im Formaldehydgel	33
2.2.20	RNA-Transfer auf Nylonmembranen	33
2.2.21	Radioaktiver Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen (Northern-Analyse)	
2.2.22	Reverse Transkription von RNA	35
2.2.23	Multiplex-PCR zum semiquantitativen Nachweis der TGF β -Expression	36
2.2.24	Untersuchung der DNA von IEC-6 Zellen auf DNA-Leiterbildung als ein Zeichen von Apoptose-Vorgängen	36
2.2.25	Untersuchungen zur Aktivierung der MAP-Kinase in IEC-6 Zellen	37
2.2.26	Statistische Meßmethoden	38

3	Ergebnisse	39
3.1	Modulation intestinaler Wundheilungsvorgänge durch Adeninnukleotide <i>in vitro</i>	39
3.1.1	Effekte ausgewählter Adeninnukleotide auf die Migration von intestinalen Epithelzellen (IEC-6) der Ratte	39
3.1.2	Untersuchungen zur TGF β -Abhängigkeit der ADP/ATP-vermittelten Migrationsstimulation	45
3.1.3	Einfluß verschiedener Adeninnukleotide auf die intestinale epitheliale Zellproliferation <i>in vitro</i>	46
3.1.4	Untersuchungen zur Abhängigkeit der ADP/ATP-vermittelten Proliferationshemmung von TGF β	48
3.1.5	Charakterisierung des für die Adeninnukleotid-vermittelte Proliferationshemmung verantwortlichen Purinrezeptorsubtyps	50
3.1.6	Untersuchung zur Wirkung des Purinrezeptoragonisten $\beta\gamma$ Methylen-ATP ($\beta\gamma$ Me-ATP) auf die Migration von IEC-6 Zellen	57
3.1.7	Bestimmung der MAP-Kinase Aktivität von IEC-6 Zellen nach Applikation von ADP, ATP und $\beta\gamma$ Me-ATP	58
3.1.8	Einfluß von Adeninnukleotiden auf die Vitalität von IEC-6 Zellen	59
3.2	Modulation intestinaler Wundheilungsvorgänge durch extrazelluläre Matrixfaktoren <i>in vitro</i>	63
3.2.1	Anwendbarkeit des Hexosaminidase-Adhäsionsassays zur Messung der Adhäsionsfähigkeit intestinaler Epithelzellen	64
3.2.2	Modulation der Adhäsionsfähigkeit von IEC-6 Zellen durch die Anwesenheit von extrazellulären Matrixfaktoren	66
3.2.3	Effekte ausgewählter extrazellulärer Matrixfaktoren auf die Migration intestinaler Epithelzellen der Ratte	68
3.2.4	Zeitabhängiger Einfluß der extrazellulären Matrixfaktoren Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV auf die Proliferation von IEC-6 Zellen	73
3.2.5	Semiquantitative PCR-Analyse der Expression von TGF β in intestinalen Epithelzellen nach Wachstum auf Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV	76
3.2.6	Bestimmung von bioaktivem und latentem TGF β in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen nach Wachstum auf extrazellulären Matrixfaktoren	78
3.3	Untersuchung zum Einfluß der Adeninnukleotide ADP und ATP auf die Expression von extrazellulären Matrixfaktoren <i>in vitro</i>	82
3.3.1	Northern-Analysen zur Expression extrazellulärer Matrixfaktoren bei IEC-6 Zellen nach Verwundung und/oder Applikation von ADP und ATP	82
4	Diskussion	85
4.1	Charakterisierung der Adeninnukleotid-vermittelten Modulationen intestinaler epithelialer Wundheilungsvorgänge	85
4.2	Analyse der Wirkungen extrazellulärer Matrixfaktoren auf intestinale epitheliale Wundheilungsvorgänge	93
4.3	Beschreibung der Wirkung von Adeninnukleotiden auf die Expression extrazellulärer Matrixfaktoren in verwundeten und intakten IEC-6 Monolayern	100
5	Zusammenfassung	101

6	Tabellenanhang	102
7	Literatur	112
8	Danksagungen	132
9	Veröffentlichungen	133
	Anhang	134

1 Einleitung

"The mechanism of epithelial cell migration from the crypts to the villi along the intestinal basement membrane is still a fascinating puzzle" (Hahn, 1990).

Die Aussage dieses Zitats von Ursula Hahn beinhaltet die Motivation für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Die Migration, als essentielles Element der Physiologie des Darms und Voraussetzung für die Wundheilung, ist in zweierlei Hinsicht ein faszinierendes Puzzle. Zum einen, da sich ihre Regulation aus einer Vielzahl einzelner Komponenten zusammensetzt, und zum zweiten, da ganz entscheidende Aspekte dieses Vorgangs noch unverstanden sind. So sollen die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente einen Beitrag leisten, die Zusammensetzung dieses Puzzles zu erweitern.

1.1 Das intestinale Epithel

Das intestinale Epithel ist ein einschichtiges hochprismatisches Zylinderepithel. Es wird von dem darunterliegenden retikulären Bindegewebe, der *Lamina propria mucosae*, durch eine Basalmembran getrennt (Frick et al., 1992). Über dem Epithel befindet sich in Richtung zum Gastrointestinallumen eine visköse Gelschicht aus muzinösen Glycoproteinen, Trefoil Peptiden und anderen kleinen Peptiden unterschiedlicher Struktur (Podolsky et al., 1995). Die Dünndarmschleimhaut verfügt über ein Grobrelief, welches von den Kerckringschen Falten (*Plicae circularis*) gebildet wird, die das Darmlumen in unvollständigen flachen Spiralen umgeben, ein Feinrelief, welches durch die ca. 0,5 bis 1,2 mm großen blattartigen oder fingerförmigen Ausstülpungen, die Dünndarmzotten (*Villi intestinales*) entsteht und das Submikrorelief, dessen Ursache die Mikrovilli sind, die 1,2 bis 1,5 µm große Auffaltungen der Plasmamembran der Enterozyten darstellen, und die in ihrer Gesamtheit als Bürstensaum bezeichnet werden (Frick et al, 1992; Feneis & Dauber, 1998).

Das intestinale Epithel verfügt über eine Vielzahl von Aufgaben zu denen die Verdauung, Nahrungsresorption, immunologische Funktionen und die Abgrenzung des Organismus zur Außenwelt gehören. Die Mukosa des Gastrointestinaltrakts ist ständig mit einer Vielzahl potentiell schädigender Substanzen innerhalb des gastrointestinalen Lumens konfrontiert. Hierzu gehören die Abbauprodukte der Mikroflora des Darms, pathogene Bakterien, Antigene, toxische Nahrungsbestandteile und luminale Komponenten, die von benachbarten Organen abgegeben werden, wie zum Beispiel Verdauungsenzyme und Gallensäurederivate. Die Aufrechterhaltung der Integrität der intestinalen Barriere ist essentiell zur Gewährleistung der normalen Homöostase. Die Regulation dieses Vorgangs ist bisher nur unvollständig verstanden (Podolsky, 1995; Podolsky et al., 1995).

Das Epithel des Dün- und Dickdarms von Säugern ist zusammengesetzt aus einer Population hochdynamischer Epithelzellen mit einem annähernd kompletten Turnover alle 24 bis 96 Stunden (Lipkin et al., 1963). Der proliferative Anteil der epithelialen Zellen ist in der Kryptenregion lokalisiert und räumlich getrennt von sich zunehmend differenzierenden Zellen entlang der vertikalen Achse des funktionalen Villus-Kompartiments. Die Balance zwischen

proliferativer und differenzierender Aktivität erfordert fein abgestimmte Mechanismen zur Regulation dieses komplexen Systems.

Die epithelialen Zellpopulationen werden von einer Vielzahl von Faktoren reguliert, die sich im Lumen des Gastrointestinaltrakts, den Epithelzellen selbst und der darunterliegenden *Lamina propria* befinden. Zu den im Lumen befindlichen Substanzen gehören Nahrungsbestandteile, Produkte der Verdauungssekrete, wie Enzyme des Magens und Pankreas, Säuren, intestinale Glycoproteine, sezernierte regulatorische Peptide, Produkte der intestinalen Darmflora (Endotoxine) und Bestandteile der Mikroflora. Bedeutende Faktoren innerhalb des Epithels sind verschiedene regulatorische Peptide, die von den Epithelzellen selbst produziert werden, lokal agierende Hormone, Produkte intestinaler Lymphozyten und lokale Zell-Zell-Interaktionen. Wichtige Faktoren, die in der *Lamina propria* präsent sind, oder aber von ihr gebildet werden, stellen regulatorische Peptide, Neurotransmitter und neurale Interaktionen dar (Dignass & Podolsky, 1994).

In den letzten Jahren konnten eine Vielzahl von regulatorischen Peptiden, die als Zytokine bezeichnet werden, im Lumen des Dünndarms, des Epithels selbst und der *Lamina propria* identifiziert werden (Kurokawa et al., 1987; Barnard et al., 1989; Koyama & Podolsky, 1989; Madara & Stafford, 1989; Chang et al., 1990; Suemori et al., 1991; Paimela et al., 1993). Diese regulatorischen Peptide beinhalten strukturell unterschiedliche Komponenten, wie Peptidwachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Kolonie-stimulierende Faktoren. Im Gegensatz zu Peptidhormonen agieren Peptidwachstumsfaktoren lokal zwischen benachbarten Zellen in parakriner oder juxtakriner Form, oder sie interagieren mit der Zelle, von der sie selbst gebildet wurden (autokrine Regulation). Das Zytokinnetzwerk der intestinalen Mukosa zeichnet sich durch eine hohe Redundanz aus; so kann ein einzelnes Zytokin von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden und auf eine große Zahl unterschiedlicher Zellpopulationen wirken (Nathan & Sporn, 1991; Dignass & Podolsky, 1994 und 1996).

Intestinale Epithelzellen sind in der Lage ein großes Spektrum an Zytokinen zu produzieren und auf sie zu reagieren. So konnte die Bildung von TGF β , TGF α , IGF-II, Interleukin-6, -8, und -15 gezeigt werden (Shirota et al., 1990; Takacs et al., 1988; Wu et al., 1990; Dignass, 1997). Die Modulation von epithelialen Funktionen ist für Interleukin-1 und -2, TNF α , IFN γ , HGF, FGF, EGF, TGF α und TGF β nachgewiesen (Dignass, 1997). TGF β kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, da festgestellt wurde, daß viele Zytokine ihre Wirkungen entfalten, indem sie Einfluß auf die Expression und Bioaktivierung von TGF β nehmen (Dignass, 1997).

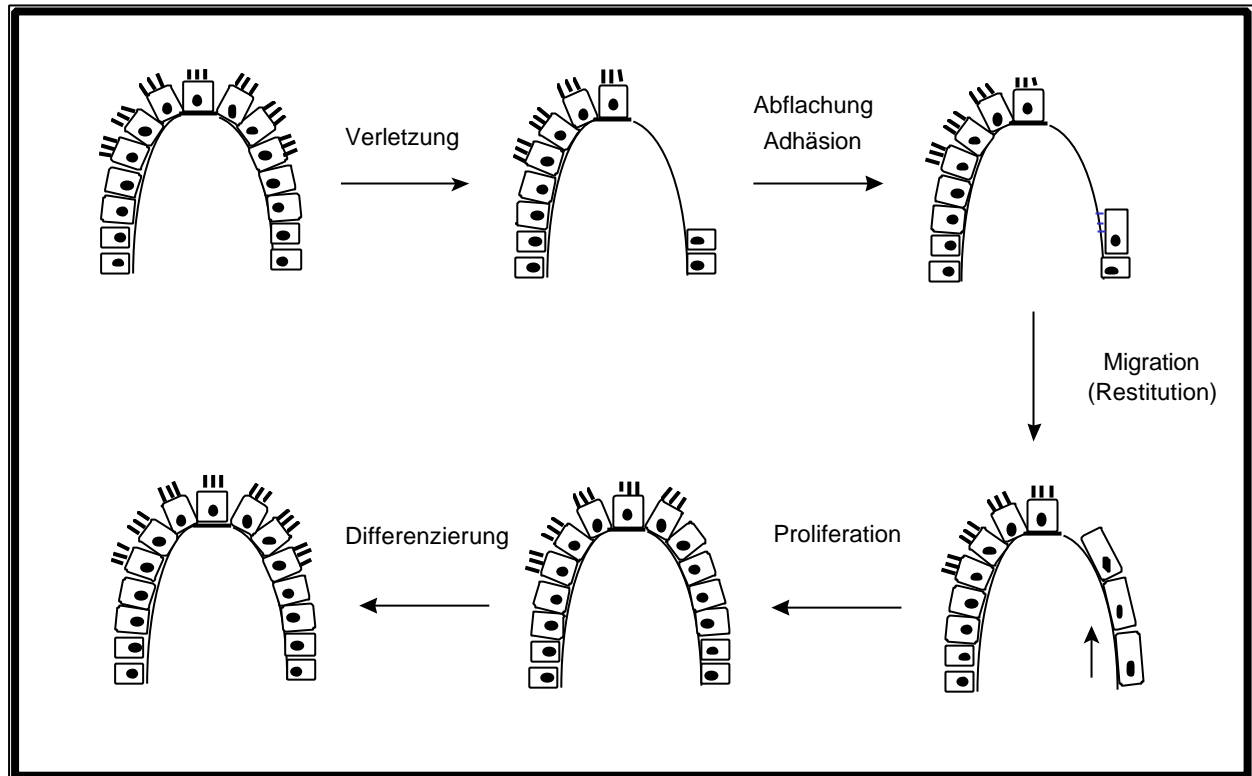
1.2 Die intestinale epitheliale Wundheilung

Das mukosale Epithel des Gastrointestinaltrakts bildet eine Barriere gegen eine Vielzahl schädigender Substanzen, die sich im Lumen befinden. Die schnelle Reparatur nach erfolgten Verletzungen ist essentiell um die normale Homöostase zu gewährleisten. Im Zusammenhang mit einer Reihe von Erkrankungen werden oberflächliche Verletzungen des Mukosaepithels beobachtet, aber auch eine mechanische Schädigung des gesunden Darms zum Beispiel durch Nahrungsbestandteile konnte gezeigt werden (McNeil & Ito, 1989). Zu den Erkrankungen, die mit gastroduodenalen Erosionen und Ulzerationen einhergehen, gehören zum Beispiel enteropathogene Infektionen, Ischämieschädigungen, Strahlenirritationen, Gluten-sensitive Sprue und vor allem chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED; englisch: inflammatory bowel diseases = IBD). Unter dem Begriff CED werden zwei Erkrankungen des Verdauungstrakts zusammengefaßt: der *Morbus Crohn* und die *Colitis ulcerosa*. Obwohl beide Erkrankungen differente pathophysiologische Merkmale aufweisen, werden sie aufgrund klinischer und therapeutischer Gemeinsamkeiten zusammen betrachtet. Die Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen ist bisher nicht geklärt, und eine dauerhafte Heilung ist nicht möglich. Die CED sind gekennzeichnet durch oberflächliche Epitheldefekte oder "Wunden" (Dignass & Goebell, 1995 und 1999). Die Zerstörung der epithelialen Barriere resultiert zunächst in einer lokalen, später auch einer systemischen Exposition der Oberfläche gegenüber schädigenden Substanzen und luminalen Antigenen, ein Phänomen, welches bei der Manifestation von Darmerkrankungen eine wichtige Rolle spielen könnte (Kirsner & Shorter, 1982). Daher ist die schnelle Reparatur auch oberflächlicher epithelialer Defekte essentiell für die Wiederherstellung der mukosalen Integrität. Beobachtungen der letzten Jahre belegen, daß die intestinale Epithelzellbarriere nach Schädigungen wie Mukosaerosionen, Ulzerationen, Einwirkung infektiöser oder toxischer Agentien und ischämischen oder Strahlenschädigungen (Strahlenenteritis) zu einer schnellen und effizienten Regeneration befähigt ist (Rutten & Ito, 1983; Feil et al., 1987; Silen, 1987 ; Lacy 1988; Moore et al., 1989, Nusrat et al., 1992).

Die Wiederherstellung der Integrität im Rahmen der epithelialen Wundheilung kann modellhaft in verschiedene Phasen unterteilt werden (verändert nach Dignass & Podolsky, 1995). Diese Vorgänge sind für die intestinale Wundheilung und auch während der physiologischen Regeneration des Epithels relevant. Wie in **Abbildung 1** schematisch dargestellt, kommt es in einer frühen Phase der Wundheilung nach einer Epithelzellverletzung in den Zellen, die dem Wunddefekt benachbart sind, zu morphologischen Veränderungen, die eine Abflachung der Zellen und die Ausbildung eines migratorischen Phänotyps zur Folge haben (Basson et al., 1992a). Die verbliebenen Epithelzellen entwickeln cytoplasmatische Gebilde an der zur Wunde gerichteten Seite der Zellen. Diese Strukturen werden je nach Autor als Lamellipodien oder Filopodien bezeichnet (Nusrat, 1987; Feil et al., 1987; Moore et al., 1989). Die Ablösung der Zellen vom Untergrund und das Knüpfen neuer adhäsiver Verbindungen gestattet den Zellen den Eintritt in die zweite Phase der Wundheilung. Diese beinhaltet die Migration benachbarter Zellen in den Wunddefekt hinein zur raschen Versiegelung verletzten Oberfläche. Diesen Vorgang bezeichnet man als epitheliale Restitution und er ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen (Silen, 1987; Lacy, 1988; Nusrat et al., 1992). Die epitheliale Migration beginnt innerhalb weniger Minuten und benötigt einige Stunden (Rutten & Ito, 1983; Feil et al., 1987; Lacy, 1988). Sie ist unabhängig von der intestinalen Proliferation, die in einer dritten Phase verlorengegangene Zellen ersetzt. Im Mittelpunkt der vierten und letzten Phase der intestinalen

epithelialen Wundheilung steht die Differenzierung der initial proliferierenden Zellen zu ausdifferenzierten Enterozyten zur Wiederherstellung der funktionalen Integrität.

Abbildung 1: Schematisches Modell der intestinalen epithelialen Wundheilung



Die modellhafte Einteilung in einzelne Phasen bedeutet nicht eine Separation in distinkte Prozesse *in vivo*. Vielmehr ist davon auszugehen, daß sich diese einzelnen Schritte überschneiden. Das dargestellte Modell ist trotzdem hilfreich um die Physiologie der Reparaturvorgänge besser zu verstehen und zu charakterisieren (Dignass & Podolsky, 1994).

Eine Vielzahl der Faktoren, die in der intestinalen Mukosa gebildet werden, ist in der Lage, die physiologischen Vorgänge der intestinalen epithelialen Wundheilung zu modulieren. Hierbei sind besonders die Zytokine zu erwähnen, die Einfluß auf die Migration, Proliferation und Differenzierung nehmen (Barnard et al., 1989; Wu & Miyamoto, 1990; Sporn & Roberts, 1991; Housley et al., 1994; Gross et al., 1995; Simmons et al., 1995; Takahashi et al., 1995; Reinecker et al., 1996). Die Effekte von Zytokinen und anderer Faktoren auf die intestinale Restitution und Proliferation können sehr gut unter Zuhilfenahme der nicht transformierten Rattendünndarmepithelzelllinie IEC-6 untersucht werden, da sie sich als Modellzelllinie für Studien zur intestinalen Migration und Proliferation eignet. IEC-6 Zellen besitzen viele Gemeinsamkeiten mit Kryptenzellen und sind auch zu einer partiellen Differenzierung befähigt (Quaroni et al., 1979; Kurokawa et al., 1987; Barnard et al., 1989; Suemori et al., 1991). Untersuchungen an IEC-6 Zellen haben gezeigt, daß die epitheliale Restitution durch TGF α , EGF, TGF β , Interleukin-1 und -2, HGF, aFGF, bFGF und IFN γ sowie Trefoil-Peptiden stimuliert wird. Bis auf Trefoil-Peptide bewirkten alle Zytokine eine TGF β -abhängige Stimulation der

Wundheilung. Auch die intestinale epitheliale Proliferation wird von verschiedenen Zytokinen moduliert. Eine Proliferationsstimulation wurde für TGF α , EGF, Interleukin-2 und -15, aFGF, bFGF, KGF, HGF und IGF beschrieben. Eine Hemmung der intestinalen Proliferation konnte bisher nur für TGF β gezeigt werden (Dignass, 1997).

Die Bedeutung von TGF β für die Modulation intestinaler epithelialer Wundheilungsvorgänge wurde von Ciacci et al. (1993) beschrieben. Trotz einer starken Hemmung der intestinalen Epithelzellproliferation, führte die exogene Zugabe von TGF β in einem *In vitro* Wundheilungsmodell zu einer signifikanten Stimulation der epithelialen Restitution. Innerhalb der TGF β -Familie, zu der auch die Inhibine, Aktivine und weitere Mitglieder gehören, kann man fünf verschiedene TGF β -Isoformen (TGF β 1-5) unterscheiden, von denen drei in Säugetieren beschrieben sind (Barnard et al., 1990; Massagué, 1990; Roberts & Sporn, 1991; Barnard et al., 1993). Als Prototyp der TGF β -Familie gilt TGF β 1, ein Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 12,5 kDa. TGF β wird als inaktive Vorstufe in den Extrazellularraum sezerniert, die aus der C-terminalen, 110 bis 140 AS langen, reifen Domäne, der 50 bis 375 AS langen Pro-Domäne und einer NH₂-terminalen Präsequenz besteht (Lodish et al., 1996). Diese Vorstufe wird als TGF β -Propeptid oder als kleiner latenter TGF β -Komplex bezeichnet. Mit diesem Komplex assoziiert ist außerdem ein großes Polypeptid von mehr als 190 kDa, das latente TGF β -Bindungsprotein (LTBP), von dem bisher 3 Isoformen bekannt sind (LTBP1-3). LTBP-1 verfügt über Sequenzcharakteristika, die man auch in Fibrillinen findet und die auf Protein-Protein-Interaktionen mit Zelloberflächenrezeptoren und extrazellulären Matrixkomponenten hindeuten (Apella et al., 1988; Rao et al., 1995). Der kleine latente TGF β -Komplex und das LTBP bilden zusammen den großen latenten TGF β -Komplex, der biologisch inaktiv ist und nicht an TGF β -Rezeptoren binden kann (Lawrence et al., 1985; Pircher et al., 1986; Miyazono et al., 1991). LTBP ist mit der Pro-Domäne über eine Disulfidbrücke verbunden (Wakefield et al., 1988). Zur Bioaktivierung und Freisetzung des reifen TGF β -Monomers, welches dann über eine Disulfidbrücke mit einem weiteren Monomer dimerisiert, ist die Abspaltung der NH₂-terminalen Sequenz, der Pro-Domäne und des LTBP notwendig. Wie die Bioaktivierung *in vivo* vollzogen wird, ist bisher nicht geklärt. Experimentell führt die Behandlung mit Säure, Harnstoff und verschiedenen Proteasen zur Freisetzung aus dem latenten Komplex (Lyons et al., 1990; Massagué, 1990; Roberts & Sporn, 1991; Sporn & Roberts, 1992). *In vivo* diskutiert man die Beteiligung von Proteasen des Plasmintyps (Lyons et al., 1990). Dies ist von besonderem Interesse, da Nakajima et al. (1997) kürzlich zeigen konnten, daß die Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und LTBP plasminsensitiv ist.

1.3 Adeninnukleotide und Purinrezeptoren

Schon lange ist die fundamentale und ubiquitäre Bedeutung intrazellulärer Nukleotide im Energiemetabolismus für die Nukleinsäuresynthese und die Enzymregulation bekannt. Darüber hinaus besitzen extrazelluläre Nukleotide und Nukleoside signifikante biologische Funktionen in vielen Zellen und Geweben. Im Jahr 1929 entdeckten Drury und Szent-Györgyi, daß Adeninhaltige Komponenten wie auch ATP, zu diesem Zeitpunkt ein neu identifiziertes und gereinigtes Biomolekül, signifikante Effekte auf den kardiovaskulären Zustand ausüben und zudem auch

andere physiologische Funktionen modulieren können. Während des folgenden halben Jahrhunderts wurden zahlreiche pharmakologische Studien in kompletten Organsystemen, isolierten Geweben und Zellpräparationen zur Wirkung extrazellulärer Adeninnukleotide unternommen. Dabei zeigte sich, daß einige der Wirkungen direkt abhängig von ATP waren, andere aber den Abbau von ATP erforderten (Dubyak & El-Moatassim, 1993). Alle Zellen besitzen ATP und verfügen über komplexe Mechanismen ATP zu synthetisieren und die intrazellulären ATP-Speicher aufzufüllen. Aber nicht nur intrazellulär finden sich signifikante Mengen ATP, auch im Blut und in allen extrazellulären Flüssigkeiten ist es vorhanden. ATP kann aus einer Vielzahl von Zellen mittels Exocytose freigesetzt werden (Gordon, 1986). Größere Mengen ADP und ATP finden sich zudem in direkter Nachbarschaft geschädigter Zellen (Kantha et al., 1992a; Dubyak & El Moatassim, 1993). Auch die Freisetzung aus Nervenendigungen gehört zu den bereits sehr früh beschriebenen Quellen von ATP.

Schon in den frühen 60er Jahren postulierten Burnstock et al. (1963) und Martinson & Muren (1963), daß der Gastrointestinaltrakt von autonomen Nerven begleitet wird, die weder cholinergene noch adrenergene Botenstoffe ausschütten, sondern sich purinergener Substanzen bedienen. Es stellte sich heraus, daß es sich bei der aus Nerven freigesetzten Substanz um ATP handelte (Eccles, 1964) und so gab man diesem Vorgang den Namen purinergene Transmission (Burnstock, 1972). Burnstock vermutete weiter, daß die Zielzellen der purinergen Nerven über Rezeptoren für Adeninnukleotide verfügen. Diese wurden als purinergene Rezeptoren oder Purinrezeptoren bezeichnet (Burnstock, 1978). Die Ergebnisse einer großen Zahl an Versuchen in einer Vielzahl von Geweben und Zellen unterstützten die vorgenommene Unterteilung in:

- 1. P1-Rezeptoren, die im wesentlichen von Adenosin aktiviert werden und**
- 2. P2-Rezeptoren, die auf ADP und ATP reagieren.**

P1-Rezeptoren werden auch als Adenosin-Rezeptoren bezeichnet. Sie sind an eine Adenylatcyclase gekoppelt und bewirken Änderungen des cAMP-Spiegels. Geringe Methylxanthin-Konzentrationen wirken an diesen Rezeptoren kompetitiv antagonistisch. Aufgrund von Studien mit Adenosin-Analoga wurden die P1-Rezeptoren später weiter unterteilt in A_1 , A_{2a} , A_{2b} und A_3 (Fredholm et al., 1994).

P2-Rezeptoren, deren hauptsächliche Liganden ADP und ATP sind, zeigen keine Sensitivität gegenüber Methylxanthinen. Für P2-Rezeptoren konnten bisher keine geeigneten Antagonisten entdeckt werden. Im Jahr 1985 wurde die erste Unterteilung der P2-Rezeptoren vorgenommen. Burnstock und Kennedy (1985) formulierten die Trennung in P2x- und P2y- Purinrezeptoren. Diese erste Einteilung beruhte auf der Beobachtung, daß P2x-Rezeptoren Vasokonstriktion und Kontraktion viszeraler glatter Muskeln bewirken, ein Vorgang der durch den ATP-Agonisten $\alpha\beta$ Me-ATP ausgelöst werden konnte, und daß P2y-Rezeptoren mit 2MeSATP als potentestem Agonisten Vasodilatation und Relaxation in den glatten Muskelzellen des Darms vermitteln. In den folgenden Jahren diente die Erstellung von Agonistenprofilen der Beschreibung verschiedener Rezeptorsubtypen. Da bis zum heutigen Tag nicht alle Rezeptoren kloniert sind, bedient man sich pharmakologischer Profile zur Charakterisierung der Rezeptoren und ihrer

Aktivität. Kurze Zeit nach Beschreibung des P2y-Rezeptors wurden der P2t Purinrezeptor, der ADP-spezifisch ist und der P2z-Rezeptor, der offensichtlich durch ATP⁴⁺ aktiviert wird, entdeckt (Gordon 1986). Hinzu kamen der P2u- (O'Connor et al., 1991) und der P2d-Rezeptor (Pintor & Mira-Portugal, 1993). Weitere Rezeptorsubtypen folgten diesen Entdeckungen. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, daß P2x-Rezeptoren Liganden-abhängige Ionenkanäle darstellen, während P2y Rezeptoren in G-Protein-Aktivierungen involviert sind (Dubyak, 1991). Die ersten P2-Rezeptoren, die kloniert wurden, waren der P2y₁-Rezeptor aus dem Gehirn von Hühnern (Webb et al., 1993) und der P2u Rezeptor aus Neuroblastomzellen (Lustig et al., 1993). Es folgten die Klonierungen von zwei P2x-Rezeptoren aus dem *Vas deferens* (Valera et al., 1994) und PC12-Zellen der Ratte (Brake et al., 1994). Im selben Jahr wurde die Nomenklatur der Purinrezeptoren von Abbraccio und Burnstock (1994) überarbeitet. Obwohl auch heute in der Literatur viele der alten Bezeichnungen verwendet werden, lassen sich die P2-Rezeptoren in zwei große Familien einteilen, die P2x- und die P2y-Familie. Die Charakteristika dieser beiden Familien, ihr Agonistenprofil und ihre Mitglieder mit den früher gültigen Bezeichnungen sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Tabelle 1: Einteilung der Purinrezeptoren in P2x- und P2y-Familien

P2x		P2y	
<ul style="list-style-type: none"> ♦ Liganden-assoziierte Kationenkanäle ♦ N- und C-Terminus intrazellulär ♦ 2 membranspannende Segmente (M1+M2) ♦ extrazelluläres Segment (270 AS) 		<ul style="list-style-type: none"> ♦ G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ♦ 7-Transmembrandomäne ♦ C-Terminus intrazellulär ♦ N-Terminus extrazellulär 	
abMe-ATP>bgMeATP>ATP»2MeSATP»ADP		2-MeSATP>ATP=ADP>abMe-ATP>bgMeATP	
P2x ₁ = P2x	P2x ₅	P2y ₁ = P2y	P2y ₅
P2x ₂	P2x ₆	P2y ₂ = P2u	P2y ₆
P2x ₃	P2x ₇ = P2z	P2y ₃ = P2t	P2y ₇
p2x ₄		P2y ₄	

Die P2x-Rezeptorfamilie unterscheidet sich erheblich von Liganden-assoziierten Ionenkanälen und stellt zudem eine Gruppe mit strukturell sehr unterschiedlichen Mitgliedern dar. Die Purinrezeptoren P2x₁ bis P2x₆ werden von distinkten Genen kodiert (Suprenant et al., 1996). Zusätzlich zu den vielen Vertretern dieser Familie sind zahlreiche Spleißvarianten beschrieben.

Die große Vielfalt der heute bekannten Purinrezeptoren spiegelt auch die große Anzahl von Wirkungen wider, die durch Adeninnukleotide vermittelt werden können. So werden biologische Antworten auf extrazelluläre Adeninnukleotide in fast jedem Organ und Gewebe beobachtet (Gordon, 1986; Dubyak & El Moatassim, 1993; Barnard et al., 1994). Adeninnukleotide spielen auch im Rahmen von Wundheilungsvorgängen eine wichtige Rolle. Sie beschleunigen zum Beispiel die epitheliale Wundheilung nach experimenteller Nierenschädigung *in vivo* und *in vitro*

(Siegel et al., 1983; Sumpio et al., 1984; Kartha & Toback, 1992a). Die Wirkung von Adeninnukleotiden im Zusammenhang mit gastrointestinalen Wundheilungsvorgängen war bisher nicht untersucht.

1.4 Die intestinale Basalmembran und ihre Bestandteile

Die Struktur und die Funktionen der Zellverbände höherer Organismen hängen in großem Maß von Interaktionen ab, die sowohl Zell-Zell-Kontakte als auch Zell-Matrix-Verbindungen betreffen. Die extrazelluläre Matrix beeinflusst eine Vielzahl zellulärer Funktionen. Sie ist beteiligt an der Regulation der Morphogenese, Wundheilung, Proliferation, Membranpolarisation, Permeabilität und Differenzierung.

Extrazelluläre Matrices bestehen aus einem komplexen Netzwerk von sezernierten Proteinen und Kohlehydraten. Die extrazelluläre Matrix verschiedener Gewebe enthält faserbildende Kollagene, Hyaluronsäure, Proteoglycane und Glycoproteine. Die Zusammensetzung der Matrix ist sehr komplex und zeigt gewebsspezifische Konfigurationen, die die unterschiedlichen Funktionen widerspiegeln (Lodish et al., 1996). Basalmembranen sind spezialisierte extrazelluläre Matrices, die Gewebe voneinander abgrenzen und an der Gewebsdifferenzierung und Morphogenese beteiligt sind (Vracko, 1974; Ekblom et al., 1986). Die Basalmembran überzieht als dünnes, blattartiges Netzwerk die basalen Oberflächen der meisten epithelialen und endothelialen Zellen. Sie trennt die Zellschicht von dem darunterliegenden Bindegewebe. Dies gilt auch für das intestinale Epithel. Die Basalmembran hat eine Dicke von 60 bis 100 nm und kann nach einer Definition von Kefalides et al. (1979) in die *Lamina lucida* (*Lamina rara*), die sich in direkter Nachbarschaft zu den Epithelzellen befindet, die *Lamina densa*, die häufig als "eigentliche Basalmembran" oder Basallamina bezeichnet wird und die *Lamina reticularis* unterteilt werden. Zu den Hauptkomponenten der intestinalen Basalmembran zählen Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen, Fibronectin und Heparansulfatproteoglycan (Hahn, 1990). Die Struktur der Basalmembran kann unterteilt werden in die molekulare Struktur jeder einzelnen Komponente und in die supramolekulare Architektur, die ein Resultat der Interaktionen verschiedener Komponenten ist.

Die Lokalisation der extrazellulären Matrixkomponenten wurde in der Basalmembran des Rattendünndarms insbesondere mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie untersucht. Diese Untersuchungen konnten zeigen, daß Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Heparansulfatproteoglycan hauptsächlich in der *Lamina densa*, also der Basallamina, zu finden sind (Quaroni et al., 1978; Laurie et al., 1982). Über den Ursprung der Basalmembrankomponenten gab es lange Zeit unterschiedliche Auffassungen. Zunächst glaubte man an eine rein epitheliale Herkunft. Diese Auffassung mußte aber revidiert werden. Obwohl Heparansulfatproteoglycan ausschließlich von Epithelzellen gebildet wird, sind Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin vorwiegend mesenchymalen Ursprungs (Simon-Assmann et al., 1990a und b; Weiser et al., 1990). Dennoch sind auch intestinale Epithelzellen in der Lage alle drei genannten Basalmembrankomponenten zu bilden (Quaroni et al., 1978; Hahn et al., 1987; McCormack et al., 1992; Göke et al., 1996).

Kollagen Typ IV ist der Hauptbestandteil der Basalmembran. Es bildet ein zweidimensionales Netzwerk mit einer Maschendraht-artigen Struktur, auf der die Reißfestigkeit der Basalmembran beruht. Als strukturelles Rückgrat unterscheidet sich Kollagen Typ IV in seinem Aufbau deutlich von den Fibrillen-formenden Kollagenen. Das Kollagen Typ IV-Molekül wird aus verschiedenen α -Ketten gebildet. Während man lange Zeit nur von der Existenz zweier verschiedener Ketten wußte, werden heute fünf verschiedene α -Ketten beschrieben ($\alpha 1(IV)$ bis $\alpha 5(IV)$). Jeweils drei Typ IV-Kollagenpeptide bilden eine 400 nm lange Tripelhelix mit großen globulären Domänen an den C-Termini und kleineren Domänen unbekannter Struktur an den N-Termini. Die am besten charakterisierte Isoform ist das $[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$ -Kollagen. Der helikale Abschnitt hat eine ungewöhnliche Struktur. Das für alle Kollagene typische Aminosäuremotiv Gly-X-Y (X und Y für beliebige AS) ist hier ungefähr 24mal durch Abschnitte unterbrochen, die keine tripelhelikale Form bilden können. Diese Bereiche sind verantwortlich für ein gewisses Maß an Flexibilität. Vier dieser Tripelhelices lagern sich durch Überlappung ihrer N-terminalen Abschnitte zu einer tetrameren Einheit zusammen, die durch Disulfidbrücken stabilisiert wird. Diese Überlappungsregion wird häufig als 7S-Domäne bezeichnet. Durch seitliche Anlagerung der tripelhelikalen Abschnitte bilden sich unterschiedliche Verzweigungen. Es entsteht, unterstützt durch Wechselwirkungen zwischen den C-terminalen globulären Domänen und benachbarten Kollagen-Molekülen, das für eine Basalmembran typische zweidimensionale Netzwerk. Der Anteil von Polysaccharidseitenketten beträgt im Kollagen IV Molekül ungefähr 10% der Gesamtmasse (Timpl, 1989; Schuppan & Riecken, 1990; Yurchenco & Schittny, 1990; Burgeson & Nimni, 1991).

Laminin stellt den Hauptanteil der nicht kollagenösen Bestandteile der Basalmembran dar. Es ist in der Lage, an eine Vielzahl anderer Basalmembrankomponenten zu binden, zu denen zum Beispiel Kollagen Typ IV, Heparansulfatproteoglycan und vor allem Nidogen zählen. Nidogen hatte man aufgrund seiner festen Bindung zunächst für eine Laminin-Untereinheit gehalten; es ist aber ein hantelförmiges Glycoprotein von ungefähr 150 kDa, welches zwei globuläre Domänen am C- und N-Terminus besitzt, die von einem stäbchenförmigen mittleren Segment getrennt werden. Laminin besteht in den meisten Fällen aus einer α -, β - und γ -Kette, die ein Molekulargewicht von 140 bis 400 kDa besitzen. Bisher sind elf verschiedene Laminin-

Isoformen beschrieben, die sich aus festgelegten Kombinationen von fünf α -, drei β - und zwei γ -Ketten zusammensetzen. Damit ist die Vielfalt der möglichen Kombinationen nicht ausgeschöpft, und es liegt offensichtlich eine Beschränkung der Kombination der einzelnen Ketten vor. Die Zusammenlagerung der drei Ketten ergibt eine kreuzartige Molekülstruktur, wobei das lange Ende von allen drei Ketten gemeinsam gebildet wird. Die kurzen Arme bestehen jeweils aus den N-Termini der einzelnen Ketten. Als Prototyp gilt das zuerst im Engelbreth-Holm-Swarm-(EHS) Tumor entdeckte Laminin-1, welches sich aus der α 1-, β 1- und γ 1-Kette zusammensetzt. In den kurzen Armen des Moleküls, also den N-terminalen Bereichen der Ketten, finden sich insgesamt sieben globuläre Domänen und 42 EGF-ähnliche Wiederholungen (Domänen III bis VI). Diese EGF-ähnlichen Motive verfügen über die Besonderheit von acht Cysteinresten, während man in anderen Proteinen häufig nur sechs Cysteinreste findet. Der von allen drei Lamininketten gebildete Verknüpfungspunkt im Inneren des Kreuzes wird von Disulfidbrücken zusammengehalten. Der lange Arm des Moleküls ist unterteilt in die Domänen I und II und besteht ungefähr aus 600 Aminosäureresten. Die β 1- und γ 1-Kette sind über eine Disulfidbrücke am Ende der helikalen Domäne I miteinander verbunden. Bei der längeren α 1-Kette schließt sich an dieser Stelle noch eine große C-terminale globuläre Domäne von über 1000 AS an. Diese als G-Domäne bezeichnete Struktur wird noch einmal in fünf Abschnitte unterteilt (G1-G5). Die Proteolyse des Laminin-Moleküls in eine Vielzahl von Fragmenten hat zu der Identifizierung vieler Bindungsdomänen für andere extrazelluläre Membrankomponenten geführt. Außerdem konnten auch RGD-Bindungssequenzen entdeckt werden (Sasaki et al., 1988; Beck et al., 1990; Engvall, 1993; Burgeson et al., 1994; Timpl & Brown, 1994; Talts, 1998)

Obwohl der Fibronectin-Anteil an der Basalmembran bei weitem nicht so groß ist wie der von Kollagen Typ IV oder Laminin, ist dieser extrazelluläre Matrixfaktor aufgrund seiner adhäsiven Fähigkeiten von großer Bedeutung für die Basalmembran. Fibronectin-Moleküle sind Dimere aus zwei ähnlichen 60 bis 70 nm langen und zwei bis drei nm dicken Polypeptiden, die über Disulfidbrücken am C-Terminus miteinander verbunden sind. Die Fibronectin-Monomere verfügen außerdem über eine große Zahl intramolekularer Disulfidbrücken. Etwa 20 verschiedene Fibronectinketten entstehen durch Spleißen des RNA-Transkripts aus einem einzigen Fibronectin-Gen. Nach vorsichtiger Proteolyse erhält man sechs verschiedene Domänen, die über spezifische und hochaffine Bindungsstellen zum Beispiel für Kollagen, Integrine und Fibrine verfügen. Jede einzelne Domäne setzt sich aus kurzen repetitiven Abschnitten zusammen, die aufgrund von Aminosäuresequenzhomologien in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden. Fibronectin verfügt über eine RGD-Sequenz in der Zellbindungsdomäne, die wichtig für die Bindung an Integrinrezeptoren ist (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984; Tamkun et al., 1984; Kornblihtt et al., 1985; Hynes, 1989)

Allen hier beschriebenen extrazellulären Matrixkomponenten ist die Bindung an spezielle Oberflächenrezeptoren gemein. Die meisten Rezeptoren für Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin gehören zur Familie der Integrine. Diese plasmamembranständigen Rezeptoren bestehen aus zwei Transmembranpolypeptiden, die als α - und β -Untereinheiten bezeichnet werden. Die meisten Zellen exprimieren mehrere verschiedene Integrine. Außerdem verfügen einzelne Integrine über eine Vielzahl von Liganden. Es sind 15 verschiedene α - und acht β -

Ketten beschrieben, von denen bisher 21 unterschiedliche Kombinationen identifiziert worden sind. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß Integrine biochemische Signale von der extrazellulären Matrix in das Zellinnere vermitteln (Ruoslahti, 1991; Hynes, 1992; Santos et al., 1997b).

Die intestinale Basalmembran und ihre Komponenten sind von besonderer Bedeutung für die epitheliale Wundheilung besonders im Zusammenhang mit oberflächlichen Verletzungen, denn sie gewähren den Epithelzellen einen Untergrund auf dem sie migrieren können. Untersuchungen belegen, daß die Basalmembran nicht synchron als eine Einheit mit den darüberliegenden Epithelzellen wandert, sondern daß die intestinalen Epithelzellen in der Lage sind entlang der Basalmembran von den Krypten zu den Villusspitzen zu migrieren. Daher sind Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Matrixfaktoren und den intestinalen Epithelzellen von herausragender Bedeutung für die epitheliale Wundheilung (Hahn et al., 1990; Trier et al., 1990).

1.5 Fragestellung

Das intestinale Epithel ist einer Vielzahl regulatorischer Einflüsse unterworfen, die in ihrer Gesamtheit trotz beträchtlichen Fortschritts in den letzten Jahren nur unzureichend verstanden werden. Aufgrund der Modulation zahlreicher epithelialer Funktionen, wie der Migration und Proliferation durch Adeninnukleotide und Bestandteile der extrazellulären Matrix in anderen Untersuchungssystemen, wurde eine wesentliche Beteiligung dieser Faktoren an intestinalen epithelialen Wundheilungsvorgängen postuliert.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen mit Hilfe geeigneter *In Vitro* Experimente die Bedeutung verschiedener Adeninnukleotide für die epitheliale Migration und Proliferation charakterisieren. Desweiteren soll der Wirkmechanismus einer Adeninnukleotid-vermittelten Modulation intestinaler Epithelzellfunktionen sowie die Beteiligung spezifischer Rezeptoren und Signalübertragungssignale an diesen Vorgängen untersucht werden. Zur Charakterisierung der Effekte extrazellulärer Matrixkomponenten muß zunächst ein geeignetes Adhäsionsmodell etabliert und ein Migrationsmodell entwickelt werden. Nach Etablierung und Validierung geeigneter *In vitro* Testsysteme werden die Effekte einzelner extrazellulärer Matrixkomponenten auf die intestinale epitheliale Adhäsion, Migration und Proliferation untersucht. Weiterhin soll geklärt werden, ob extrazelluläre Matrixfaktoren in einen TGF β -Feedback-Regulationmechanismus involviert sind. Abschließend wird untersucht, ob Adeninnukleotide eine Modulation intestinaler Epithelzellfunktionen durch eine veränderte Expression von extrazellulären Matrixfaktoren bewirken.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

A. Allgemein

Adeninnukleotide und P2-Rezeptoragonisten und -antagonisten

- Sigma, Deisenhofen

Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Antikörper

- Rekombinantes humanes TGF β_1 : R & D Systems, Wiesbaden
- TGF β neutralisierender AK: R & D Systems, Wiesbaden

Extrazelluläre Matrixfaktoren (Fibronektin, Kollagen Typ IV, Laminin)

- Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg

B. Zellbiologie

Zellkulturmedien und Medienzusätze

- Biochrom KG, Berlin
- Sigma, Deisenhofen

In Vitro-Wundheilungsmodell

- Rasierklingen (Apollo-ever sharp): Solingen, Solingen

In Vitro-Migrationsmodell

- Stahlzylinder ("steel fences"): Feinwerkstatt, Tumorforschung, Universitätsklinik Essen

Zellproliferationsuntersuchungen

- MTT-Formazan: Sigma, Deisenhofen
- DMSO: Serva, Heidelberg

TGF β -Peptid-Bestimmungen

- TGF β_1 Emax Immuno Assay System: Promega, Mannheim

Hexosaminidase-Adhäsionsassay

- p-Nitrophenol-N-acetyl- β -D-Glucosamid: Fluka, Neu-Ulm

Untersuchung auf Mycoplasmen

- ICN Hoechst Stain Kit: ICN, Meckenheim

Sonstige Reagenzien und Chemikalien

- Boehringer, Ingelheim
- Boehringer, Mannheim
- Biozym Diagnostik, Hameln
- Calbiochem, Bad Soden
- Fluka, Neu-Ulm
- Merck, Darmstadt
- Serva, Heidelberg

C. Molekularbiologie

Apoptose-Untersuchung

- Apoptotic DNA Ladder Kit: Boehringer, Mannheim

Plasmid-DNA Isolation

- Plasmid Midi & Maxi Kit: Qiagen, Hilden

Restriktionsenzyme und molekulare Marker

- MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- Promega, Mannheim
- Sigma, Deisenhofen

Gesamt-RNA Isolation

- TRIzol®REagent: Gibco, Life Technologies, Karlsruhe

mRNA Isolation

- mRNA Purification Kit: Pharmacia, Freiburg

cDNA-Markierung und Aufreinigung radioaktiv-markierter cDNA-Proben

- Oligolabelling Kit: Pharmacia, Freiburg
- Probe QuantTMG50 Micro Columns: Pharmacia, Freiburg

Northern Blot Hybridisierung

- Lachssperma-DNA: Sigma, Deisenhofen

Reverse Transkription für die PCR

- Ready to use First Strand cDNA Synthesis Kit: Maxim Biotech, San Francisco, USA

Multiplex PCR

- Amplitaq[®] DNA Polymerase: Perkin Elmer, Weiterstadt
- GeneAmp[®] 10x PCR-Buffer: Perkin Elmer, Weiterstadt
- dNTPs: Maxim Biotech, San Francisco, USA
- 3' und 5' Primer für humanes G3PDH: Clontech, Heidelberg
- 3' und 5' Primer für Ratten-TGF β_1 : Clontech, Heidelberg

MAP-Kinase Messungen

- MEK1 Inhibitor (PD98059): New England Biolabs, München
- Proteaseinhibitoren: Fluka, Neu-Ulm
- Bio-Rad Protein Assay: Bio-Rad, München

Radiochemikalien

- $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP: Amersham-Buchler, Braunschweig
- $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP: DuPont-NEN, Bad Homburg

Sonstige Reagenzien und Chemikalien

- Boehringer, Mannheim
- Boehringer, Ingelheim
- Genzyme, Rüsselsheim

- MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- Serva, Heidelberg
- Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Glas- und Plastikmaterialien

Zellkulturschalen, 6-, 24- und 96-well Gewebekulturschalen

- Greiner Labortechnik, Frickenhausen
- Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg

Zellschaber

- Costar, Cambridge, USA

Filtereinheiten

- Nunc, Wiesbaden
- Corning, Bad Hoevedorp, Niederlande

2.1.3 Membranen und Filmmaterialien

Filterpapiere und Nylonmembranen

- Whatman 3MM Papier: Schleicher und Schuell, Dassel
- Whatman Phosphorzellulose Papiere P81: Schleicher und Schuell, Dassel
- HybondTM-N Nylonmembran: Amersham-Buchler, Braunschweig

Filmentwicklung

- Kodak X-OMAT AR Filme: Eastman Kodak Company, Rochester, USA
- Kodak APX 100: Eastman Kodak Company, Rochester, USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

A. Allgemein

1. TGFb Stammlösung

2	µg/ml	TGFβ
4	mM	HCl
1	mg/ml	BSA (Fraktion V)

→ ad 1 ml Kulturmedium

B. Zellbiologie**I. Zellkultur****1. Zellkulturmedium für IEC-6 Zellen**

DMEM mit:

4,5	g/l	Glukose
4	mM	Glutamin
100	U/ml	Penicillin
100	µg/ml	Streptomycin
5	µg/ml	Insulin
5	%	FKS

2. Synchronisationsmedium für IEC-6 Zellen

DMEM mit:

4,5	g/l	Glukose
4	mM	Glutamin
100	U/ml	Penicillin
100	µg/ml	Streptomycin
0,1	%	FKS

II. MTT-Formazan Assay zur Untersuchung der Zellproliferation**1. MTT-Lösung**

1	x	PBS Puffer
4	mg/ml	MTT

III. TGFb -ELISA zur Bestimmung von aktivem und latentem TGFb₁**1. DPBS-Puffer**

0,2	g	KCl
8	g	NaCl
1,15	g	Na ₂ HPO ₄
133	mg	CaCl ₂ x H ₂ O
100	mg	MgCl ₂ x 6 H ₂ O

→ ad 1 l aqua dest.

→ pH 7,35

1. Karbonat-Puffer zur AK-Beschichtung

25	mM	NaHCO ₃
25	mM	Na ₂ CO ₃

→ pH 9,7

3. TBST-Waschpuffer

20	mM	TrisHCl, pH 7,6
150	mM	NaCl
0,05	%	Tween 20

IV. Hexosaminidase-Assay zur Untersuchung der Zelladhäsion

1. Blockierungspuffer

1	x	PBS Puffer
3	%	BSA (Fraktion V)

2. p-Nitrophenol-N-acetyl- β -D-Glucosamid-Substratlösung

0,1	M	NaCitrat
7,5	mM	p-Nitrophenol-N-acetyl- β -D-Glucosamid
0,25	%	Triton X 100

→ pH 5,0

3. Glycin-Stopp-Lösung

Lösung A:

50	mM	Glycin
50	mM	NaCl

Lösung B:

0,1	N	NaOH
-----	---	------

→ Für 10 ml Lösung 5,41 ml Lösung A mit 4,59 ml Lösung B mischen, 5 mM EDTA zufügen

→ pH 10,4

V. Sonstige Puffer und Lösungen für die Zellbiologie (alphabetisch)

1. Insulin-Stammlösung

500	$\mu\text{g/ml}$	Insulin
1	%	Essigsäure

2. 10x PBS⁻-Puffer (ohne Mg und Ca)

140	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
1,4	mM	KH ₂ PO ₄
6,4	mM	Na ₂ HPO ₄

→ pH 7,2

3. 10x PBS⁺-Puffer (mit Mg und Ca)

140	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
1,4	mM	KH ₂ PO ₄
6,4	mM	Na ₂ HPO ₄
0,5	mM	MgCl ₂
0,9	mM	CaCl ₂

→ pH 7,2

C. Molekularbiologie

I. Bakterienkultur

1. LB-Medium

10	g	NaCl
10	g	Trypton
5	g	Hefeextrakt

2. LB-Agar

10	g	NaCl
10	g	Trypton
5	g	Hefeextrakt

→ ad 1 l mit Aqua dest.
→ pH 7,4

3. Ampicillin-Stammlösung

50 mg/ml Ampicillin

5. Chloramphenicol-Stammlösung

34 mg/ml Chloramphenicol
100 % Ethanol

15 g Agar

→ ad 1 l mit Aqua dest.
→ pH 7,4

4. Tetracyclin-Stammlösung

10 mg/ml Tetracyclin
100 % Ethanol

II. RNA-Formaldehydgele

1. 5x Formaldehydgel-Laufpuffer

100 mM MOPS
40 mM NaAc
5 mM EDTA

→ pH 7,0

2. Formaldehydgel-Ladungspuffer

50 % Glycerol
1 mM EDTA
0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylene Cyanol

III. RNA-Transfer auf Membranen (Alkaline Downward Blot)

1. Transferpuffer

3 M NaCl
8 mM NaOH
2 mM N-Laurylsarkosin

2. Neutralisationspuffer

0,2 M NaPhosphatpuffer

→ pH 6,7-6,8

3. Methylenblau-Färbelösung

0,3 M NaAc
0,03 % Methylenblau

IV. Northern-Hybridisierung

1. 50x Denhardt's Reagenz

0,5 g Ficoll
0,5 g Polyvinylpyrrolidon
0,5 g BSA (Fraktion V)

→ ad 50 ml mit Aqua dest.

2. 20x SSC

175,3 g NaCl
88,2 g NaCitrat

→ ad 1000 ml mit Aqua dest., pH 7,0

3. 10% SDS

10 g Sodiumdodecylsulfat

→ ad 100 ml mit Aqua dest.

4. Prähybridisierungslösung

50	%	Formamid
5	x	SSC
1	%	SDS
2	x	Denhardt's Reagenz
110	µg/ml	Lachssperma-DNA

5. Hybridisierungslösung

50	%	Formamid
5	x	SSC
1	%	SDS
1	x	Denhardt's Reagenz
110	µg/ml	Lachssperma-DNA

V. MAP-Kinase Bestimmungen**1. Proteinase-Inhibitoren: Stammlösungen***PMSF*

200	mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
100	%	Isopropanol

PepstatinA

2	mM	Pepstatin A
100	%	Ethanol

Leupeptin

10,5	mM	Leupeptin
------	----	-----------

Aprotinin

768	µM	Aprotinin
-----	----	-----------

2. Lysepuffer

50	mM	β-Glycerophosphat
100	µM	Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄)
2	mM	MgCl ₂
1	mM	EGTA
0,5	%	TritonX100
1	mM	Dithiotreithol
1	mM	PMSF
20	µM	Pepstatin A
20	µM	Leupeptin
0,01	µM	Aprotinin

3. MgCl₂/PKI

50	mM	MgCl ₂
4	µM	PKI

4. γ³²P-ATP*

2	µCi/µl	γ ³² P-ATP*
---	--------	------------------------

5. ³²P-ATP*/P

200	µM	ATP (kalt)
0,1	µCi/µl	γ ³² P-ATP*

6. Adrenalin

10	mM	HCl
0,01	M	Adrenalin

VI. Multiplex PCR**1. 6x Blau/Orange-Gelladungspuffer**

10	%	Ficoll 400
0,25	%	Bromphenolblau
0,25	%	Xylencyanol FF
0,4	%	Orange G
10	mM	TrisHCl (pH 7,5)
50	mM	EDTA

VII. Sonstige Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie (alphabetisch)

1. DEPC-behandeltes Aqua dest.

1 % Diethylpyrocarbonat
→ 24 h bei 37° C inkubieren

2. Ethidiumbromid (EtBr)-Stammlösung

10 mg/ml EtB

3. RNaseA-Stammlösung (DNase-frei)

10 mg/ml RibonukleaseA
0,01 M NaAc
→ 15 min bei 100°C
→ pH 7,4

4. 5x TBE-Puffer

54,0 g TrisBase
25,5 g Borsäure
1 mM EDTA
ad 1 l aqua dest.

5. 6x TBE-Gelladungspuffer

30 % Glycerin
0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol FF

6. 100x TE-Puffer

1 M TrisHCl
0,1 M EDTA

→ pH 8,0

2.1.6 Zelllinien

Für die verschiedenen Zellkulturuntersuchungen wurde die intestinale Rattendünndarm-Epithelzelllinie IEC-6 (intestinal epithelial cell line no 6) verwandt. Sie wurde bei der American Type Culture Collection (ATCC Nr. CRL-1592) bezogen. Es handelt sich um eine detailliert charakterisierte, adhärenz Zelllinie (Quaroni et al., 1979).

2.1.7 Bakterienstämme und Vektoren

Die verwendeten Bakterienstämme und Vektoren wurden von der Firma ATCC bezogen. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Charakteristika der verwendeten Klone. Die Fibronectin-Sonde enthält 190 Bp der 3'-terminalen Region des Fibronectin-Gens und trägt den Namen pFH111 (Kornblith et al., 1985). Das Insert der Kollagen IV α 1-Sonde enthält die Nukleotide 1-890 (Datenzettel, ATCC), der unter der Bezeichnung GenBank X06777 registrierten Sequenz. Der Klon hat die Bezeichnung pCIV-1-C87 und kodiert für das N-terminale Signalpeptid, die 7S-Region, die NC-2-Domäne und einen kleinen Teil der α -helikalen Domäne (Wood et al., 1988). Die Lamininsonde umfaßt das 3'EcoRI-Fragment des Klons HL-94 (Pikkarainen et al., 1987), beginnend vom Nukleotid 330 bis zum Nukleotid 1090 (Datenzettel, ATCC) und wird als HL-94A bezeichnet. Die cDNA-Sonde enthält das Signalpeptid und den 5'-terminalen Bereich des für die Laminin- β 1-Kette kodierenden Gens. Vor Einführung der neuen Nomenklatur (Burgeson et al., 1994) wurde die β 1-Kette als Laminin B1 bezeichnet.

Tabelle 1: Bakterienstämme und Vektoren zur Herstellung von cDNA-Sonden zur Detektion der RNA extrazellulärer Matrixfaktoren

	Fibronectin 1	Kollagen Typ IV a1	Laminin b 1
Name des Klons	pFH111	pCIV-1-C87	HL-94A
Bakterienstamm	E. coli UC12187	E. coli	E. coli MC1061
Resistenz	ampR	tetR	ampR, tetR
Vektor	pAT153/PvuII/8	pBR322	pBR322
Vektorgröße (Kb), intakt	3,320	4,363	4,363
Insertgröße (Kb)	1,9	1,0	0,8
Restriktionsenzym	EcoRI	PstI	EcoRI
Fragmentgröße (Kb)	3,6 + 1,5	4,4 + 1,3	4,4 + 0,8
ATCC-Nr.	61040	63020	65010
Referenz	Kornblith et al., 1985	Wood et al., 1988	Pikkarainen et al., 1987

2.1.8 Gensonden

Als interner Größenstandard zur Überprüfung der gleichmäßigen Auftragung von RNA bzw. mRNA, wurden alle Northern Blots mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert. GAPDH eignet sich besonders als "housekeeping gene", da es in vielen Zellen und Geweben in konstanten Mengen exprimiert wird. Die pTRI-GAPDH-Sonde enthält ein 316 Basenpaar langes Fragment des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-Gens aus der Ratte, welches von den Exons 5-8 stammt (Tso et al., 1985). Die Sequenz ist unter der Bezeichnung GenBank X=02231 registriert (Fort et al., 1985).

2.2 Methoden

A. Zellbiologische Methoden

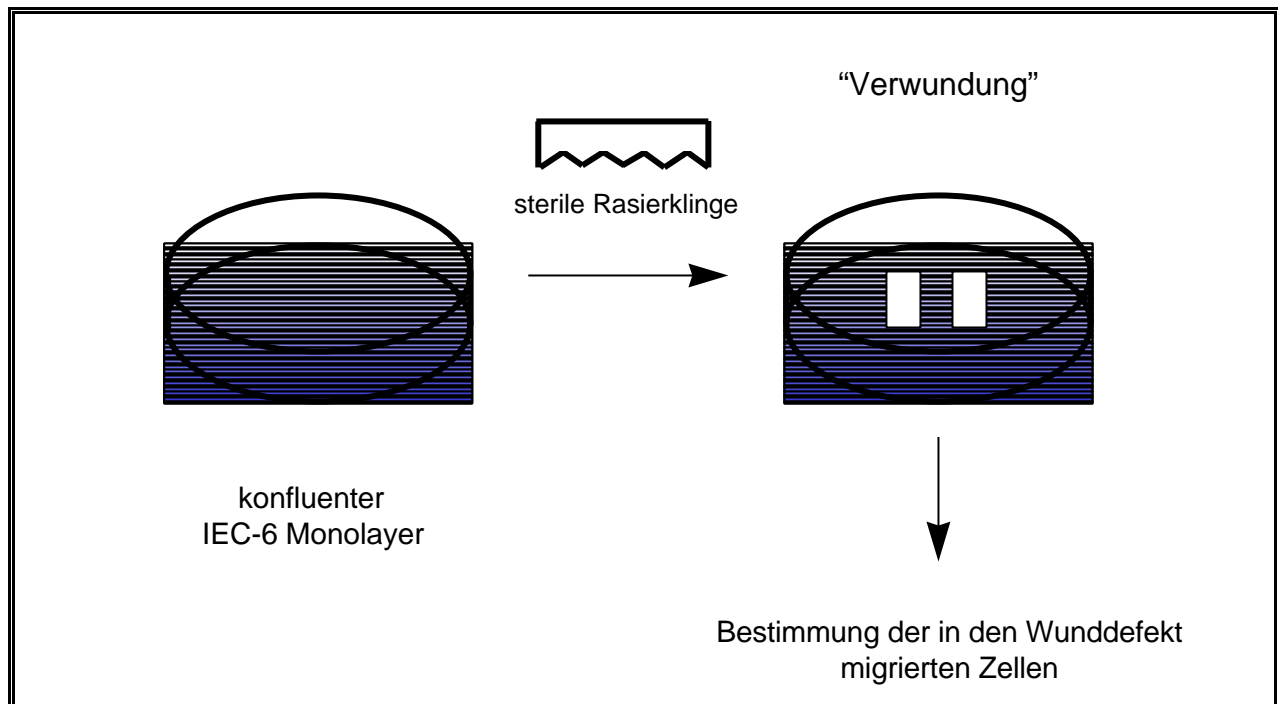
2.2.1 Zellkultur

Die Rattendünndarm-Epithelzelllinie IEC-6 wurde mit Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und 5% fötalem Kälberserum (FKS) unter Standardbedingungen (37 °C, 8% CO₂, gesättigte Wasserdampfatosphäre) kultiviert. Das Kulturmedium wurde mit 4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 5 µg/ml Insulin komplementiert. Zellkulturuntersuchungen wurden an IEC-6 Zellen mit Passagenummern (#) von 16 bis 24 durchgeführt, wobei sich die Passage innerhalb einer Untersuchung um nicht mehr als fünf Passagen unterschied. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff mit 8% Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel gelagert. Bei Erhalt waren die Zellen Mycoplasmen-frei. Sie wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmenfreiheit (Kapitel 2.2.2) untersucht. Der Mediumwechsel der adhärennten Zellkulturen wurde dreimal wöchentlich vorgenommen. Zum Passagieren der Zellen wurden diese nach Entfernen des alten Mediums einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g Trypsin/0,2 g EDTA) abgelöst. Der Ablösevorgang wurde im Mikroskop kontrolliert. Zur Neutralisierung der Trypsinwirkung wurde frisches Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden mehrfach auf- und abpipettiert, um bestehende Zellaggregate zu trennen. Im Anschluß wurde die so erhaltene Zellsuspension auf neue Zellkulturschalen verteilt. Zur Untersuchung der Vitalität nach der Trypsinierung wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau gefärbt und in der Neubauerkammer ausgezählt. Der Anteil vitaler Zellen betrug zwischen 96 und 99%.

2.2.2 Untersuchung der Zellkulturen auf Mycoplasmen

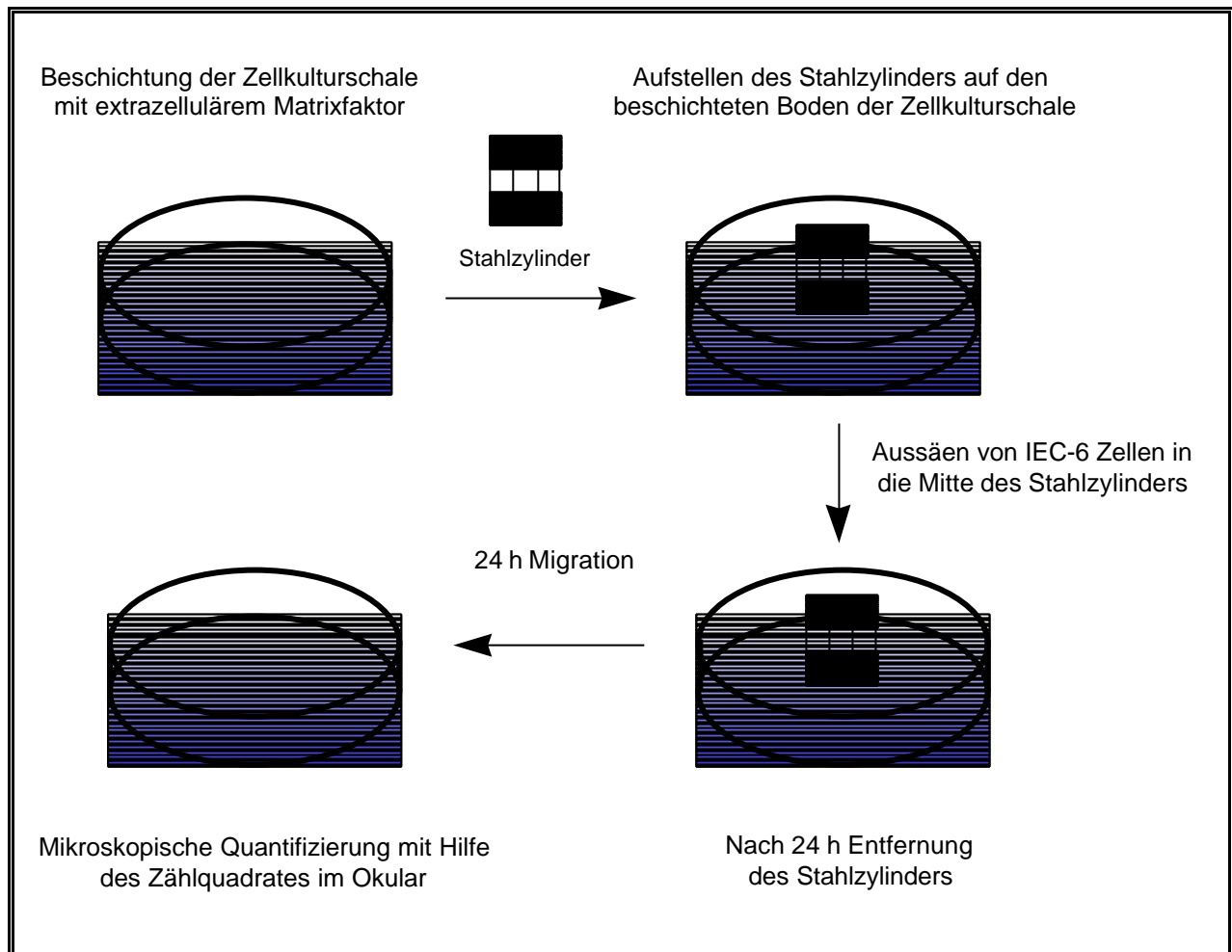
Die Untersuchung der Zellkulturen auf Mycoplasmen wurde nach einer Methode von Chem (1977) und Russell et al. (1975) mit dem Hoechst-Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst 33258) durchgeführt. Hierzu wurden IEC-6 Zellen auf Glasobjektträgern in Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 50-80% angezüchtet. Zur Färbung wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, so daß die Zellen nur noch von einem dünnen Flüssigkeitsfilm bedeckt waren. Die Objektträger mit den subkonfluenten Zellen wurden mit Carnoy's Fixierlösung bedeckt und drei Minuten fixiert. Das Fixativ wurde entfernt und erneut für 10 Minuten zugegeben. Nach 30minütiger Trockenzeit erfolgte die Färbung mit 1 ml Hoechst-Färbelösung pro Objektträger für 10-30 Minuten. Das restliche Färbemittel wurde entfernt, und die Objektträger wurden dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach einer weiteren Trockenzeit von 10 Minuten konnten die Präparate in einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX50) betrachtet werden. Die Anregungswellenlänge betrug 360 nm; die Betrachtung konnte bei 490-500 nm erfolgen. Bei einer 400-1000fachen Vergrößerung erscheinen negative Kulturen nur im Nukleusbereich gefärbt, während positive Kulturen zudem Färbungen außerhalb des Nukleus aufweisen (sphärische Körperchen).

Abbildung 2: *In vitro* Wundheilungsmodell



2.2.3 *In vitro* Wundheilungsmodell

Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Adeninnukleotide und Adeninnukleotidagonisten auf die intestinale epitheliale Restitution *in vitro* wurden modifiziert nach einer von Sato und Rifkin (1989) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu wurden IEC-6 Zellen in 60 mm oder 90 mm Zellkulturschalen unter Standardbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Serumreduktion wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺-Puffer gewaschen und für 10-16 h mit DMEM und 0,1% FCS inkubiert. Die Erzeugung der Wunden wurde mit sterilen Rasierklingen durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen an 2-3 Stellen pro Zellkulturplatte mit Hilfe der Rasierklinge entfernt. Die "Wunden" lagen hierbei ungefähr 1 cm weit auseinander (**Abbildung 2**). Durch das Aufsetzen der Rasierklingen entstand ein glatter Wundrand, der durch die Einkerbung auf dem Plastikuntergrund auch nach dem Überwachsen mit Zellen gut zu erkennen war. Zur Entfernung abgelöster Zellbestandteile wurde der Monolayer nach Einbringung der Wunden zweimal mit PBS⁺-Puffer gewaschen. Zur Quantifizierung geeignete Wundränder wurden mit Hilfe eines dünnen wasserfesten Stiftes auf der Unterseite der Zellkulturschale markiert. Zur Untersuchung der Adeninnukleotid- oder Adeninnukleotid-Agonisten-Wirkung auf die epitheliale Restitution *in vitro* wurden die verletzten Monolayer für die Dauer von 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen in DMEM mit 0,1% FCS inkubiert. Eine Quantifizierung der epithelialen Restitution erfolgte durch Bestimmung der Anzahl migrierter Zellen in den Wundbereich. Zur Dokumentation und anschließenden Auszählung wurden von den markierten Bereichen standardisierte Fotos bei 100- oder 200facher Vergrößerung mit Hilfe eines Nikon TMS (Typ 104) Mikroskops und einer Nikon F-601 Kamera angefertigt. Die über den Wundrand migrierten Zellen wurden anhand der Fotos ausgezählt, in Bezug zu den Kontrollen ohne Testsubstanzen gesetzt, und in Prozent Migration berechnet.

Abbildung 3: In vitro Migrationsmodell

2.2.4 In vitro Migrationsmodell

Zur Untersuchung der Migration von intestinalen Epithelzellen auf verschiedenen Matrixfaktoren wurde ein von Pratt et al. (1984) vorgestelltes Modell für Endothelzellen aus Schweineaorten an die Versuchsanforderungen für Epithelzellen adaptiert. Hierzu wurden rostfreie Stahlzylinder mit einer inneren Bohrung (Innendurchmesser: 3 mm, Außendurchmesser: 25 mm) gefertigt (Feinmechanikwerkstatt der Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen). Diese Stahlzylinder wurden auf den Boden von 60 mm Zellkulturschalen oder 6-well Gewebekulturschalen gestellt, die zuvor mit Matrixfaktoren beschichtet worden waren. In die innere Vertiefung des Stahlzylinders wurden IEC-6 Zellen von großer Dichte (2×10^5 Zellen/250 μ l) ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und waren nach 24 h zu einem konfluenten Monolayer gewachsen. Der Stahlzylinder wurde vorsichtig entfernt, um einen glatten Zellrand zu erhalten. Das Ende des Monolayers wurde mit einem dünnen wasserfesten Stift auf der Unterseite der 6-well Gewebekulturschale markiert. Nach 24 h wurde die Migration der Zellen

über den markierten Startpunkt hinaus ausgezählt. Hierzu wurde eine Zählmarkierung, die aus 10 x 10 exakt gleichen Quadraten besteht, in das Okular des Mikroskopes eingebracht. Dieses Zählquadrat wurde bündig an den zuvor markierten Startpunkt gelegt und erlaubte die Beurteilung der Anzahl migrierter Zellen, differenziert nach Zonen 1-10 (Zone 1 entsprach hierbei der nächsten Entfernung, Zone 10 der weitesten Entfernung vom Startpunkt).

2.2.5 Mitomycin-Vorbehandlung

Zur Differenzierung, ob es sich bei der beobachteten epithelialen Restitutionsstimulation um eine Zunahme der Migration oder Proliferation handelte, wurde eine Vorbehandlung der IEC-6 Monolayer mit Mitomycin C vorgenommen. Ergebnisse aus Dosisfindungsstudien hatten gezeigt, daß eine vollständige Hemmung der intestinalen epithelialen Zellproliferation mit 2 µg/ml Mitomycin erreicht werden kann, ohne daß die Vitalität der IEC-6 Zellen beeinträchtigt wird. Konfluente Monolayer wurden für 2 h mit 2 µg/ml Mitomycin C in serumreduziertem Kulturmedium unter Standardbedingungen vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine fünfmalige Waschung mit DMEM ohne Zusätze, um die vollständige Entfernung des Mitomycins C zu gewährleisten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Dignass und Podolsky (1993) überein, die zeigen konnten, daß es sich bei der Migration von IEC-6 Zellen um einen proliferationsunabhängigen Prozeß handelt.

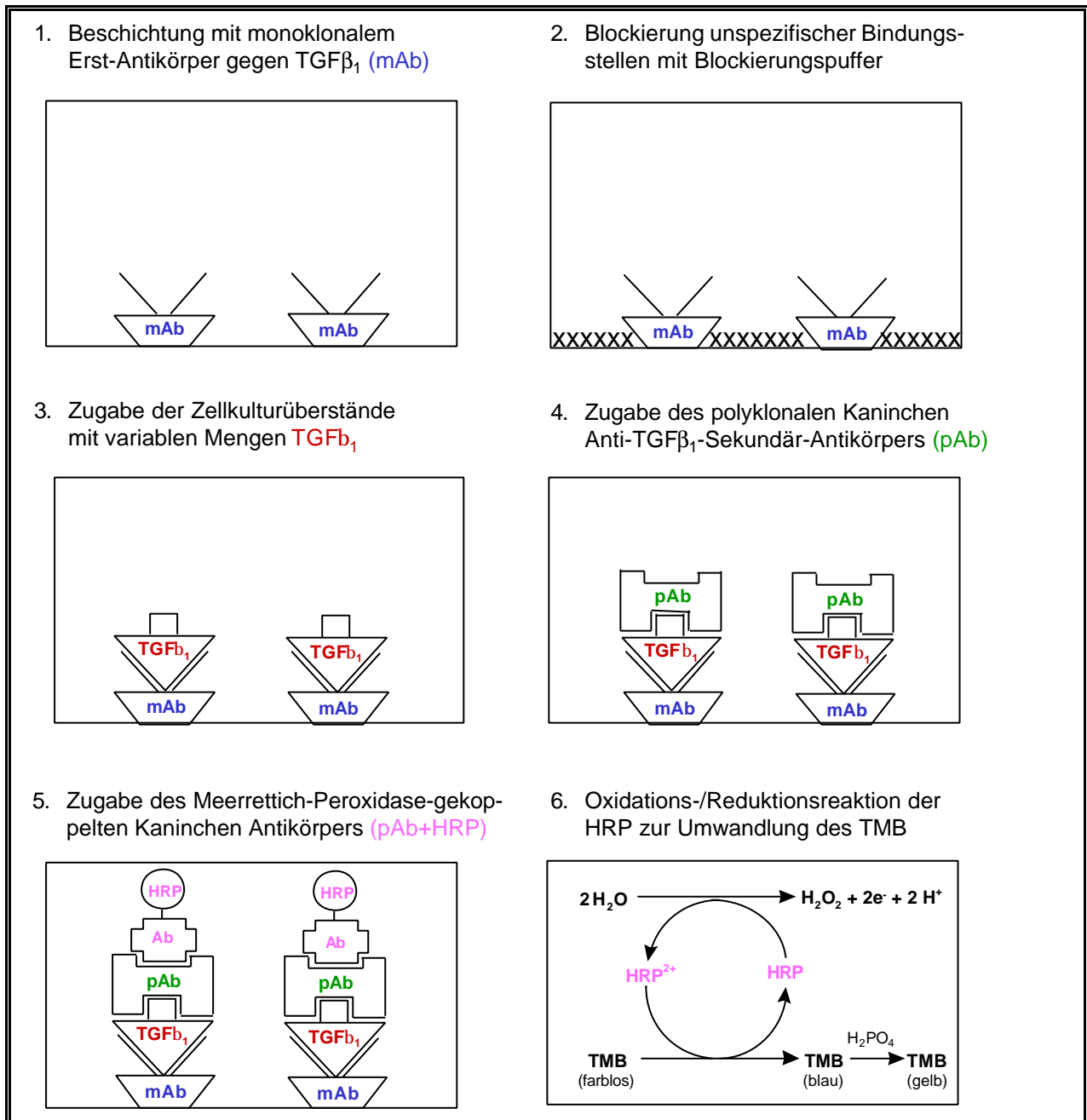
2.2.6 Bestimmung der intestinalen epithelialen Zellproliferation *in vitro*

Die Bestimmung der intestinalen epithelialen Zellproliferation *in vitro* erfolgte mit Hilfe eines nichtradioaktiven colorimetrischen Assays unter Verwendung von MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid). Dieser Test wurde 1983 von Mosman et al. erstmals beschrieben und von mehreren Wissenschaftlern in den folgenden Jahren optimiert (Tada et al., 1986, Denizot & Lang, 1986, Camichael et al., 1987). Der Assay ist besonders geeignet zur Quantifizierung lebender, metabolisch aktiver Zellen. Sein Testprinzip beruht auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen, wobei violette Kristalle entstehen. Diese können in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und anschließend im Spektralphotometer quantifiziert werden. Zur Untersuchung der Zellproliferation von IEC-6 Zellen wurden je nach Versuchsbedingungen zwischen 2×10^4 und 5×10^4 Zellen in 500 µl Zellkulturmedium in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturschale ausgesät. Die zu untersuchenden Testsubstanzen wurden ebenfalls in den entsprechenden Konzentrationen in 500 µl Kulturmedium gelöst und zu den Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation unter Standardbedingungen von 24 h, 48 h oder 72 h. Vier Stunden vor Ablauf der festgelegten Inkubationsdauer wurden 100 µl der MTT-Stocklösung (4 mg/ml) zu den Zellen gegeben. Nach vierstündiger Inkubationszeit bei 37 °C unter Standardbedingungen wurde das Zellkulturmedium vorsichtig, unter Vermeidung einer Beschädigung der am Boden befindlichen Kristalle, abgesaugt. Die Formazankristalle wurden in 1000 µl DMSO gelöst. Im Spektralphotometer wurde bei einer Meßwellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm die

Absorption - nach dem Abgleich gegen reines DMSO - bestimmt. Die Werte wurden in Prozent Proliferation im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle ohne Zusätze berechnet.

2.2.7 Bestimmung von aktivem und latentem TGF β_1 in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen

Bioaktives und Gesamt-TGF β_1 in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen wurde mit Hilfe einer ELISA-Methode bestimmt. Die Vorgehensweise erfolgte nach der Versuchsbeschreibung des Herstellers (Promega, Mannheim). Eine Gewebekulturplatte mit 96 Vertiefungen wurde zunächst mit einem monoklonalen IgG Antikörper(mAb) (1 mg/ml), der lösliches TGF β_1 binden kann, beschichtet und für 16-20 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Blockierungspuffer zu den Vertiefungen gegeben, um unspezifische Bindungen abzudecken. Zur Bestimmung von bioaktivem TGF β_1 wurden die Zellkulturüberstände unverdünnt eingesetzt. Zur Aktivierung des latenten TGF β_1 in den Mediumüberständen wurden diese mit 4/5 DPBS Puffer versetzt und mit 1/50 Volumen 1N HCL angesäuert. Eine Neutralisierung wurde nach 15minütiger Inkubationszeit bei RT mit 1/50 Volumen 1 N NaOH vorgenommen. Die so aktivierten Zellkulturüberstände repräsentierten die Gesamt-Menge an TGF β_1 . Die aktivierten Proben wurden 1 : 1 mit Probenpuffer versetzt. Der Blockierungspuffer wurde von der ELISA-Platte abgegossen. Nach Zugabe definierter TGF β_1 -Mengen in Form einer Standardkurve (16,13 pg bis 1000 pg) wurden jeweils 100 μ l der unverdünnten und 100 μ l der aktivierten Proben zu der 96-well Gewebekulturplatte gegeben. Die Inkubation von 90 Minuten erfolgte bei RT auf einem Schüttler mit 500 \pm 100 rpm (Umdrehungen pro Minute). Die Proben wurden danach abgegossen, und die 96-well Platte 5 x mit TBST-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundenes TGF β_1 vollständig zu entfernen. In einem weiteren Inkubationsschritt (2 h, RT, 500 \pm 100 rpm) wurde polyklonaler Kaninchen-Anti-TGF β_1 Antikörper (1 mg/ml) (pAb) zugegeben. Dieser sekundäre Antikörper war in der Lage, das bereits spezifisch an den Erst-Antikörper geheftete TGF β_1 zu binden. Nach zweistündiger Inkubation bei RT (500 \pm 100 rpm) und fünfmaligem Waschen zur Entfernung unspezifisch gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte die Zugabe des tertiären Reagenz, welches an den sekundären, polyklonalen Kaninchen-Anti-TGF β_1 Antikörper bindet. Hierzu diente ein Spezies-spezifischer Antikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase (Ab-HRP) gekoppelt ist. Nach einer weiteren Inkubationsperiode von 2 h bei RT (500 \pm 100 rpm) wurde erneut 5 x mit Waschpuffer gewaschen, um ungebundenes Konjugat zu entfernen. Die Antikörper-gebundene Meerrettichperoxidase setzte anschließend zugegebenes, farbloses TMB-Substrat zu blauem TMB um, welches von Phosphorsäure zu einem gelben Farbstoff umgewandelt wurde. Die Menge an gebundenem TGF β_1 ist proportional zu dem Farbreagenz, welches sich in der Oxidations-/Reduktionsreaktion generierte und bei 450 nm im Spektralphotometer gemessen wurde. Zur Berechnung der Menge an latentem TGF β_1 wurde die Menge an bioaktivem TGF β_1 von der Gesamtmenge subtrahiert. Anhand der Eichkurve wurde eine Regressionsgerade erstellt, und die ermittelten Werte anhand dieser berechnet.

Abbildung 4: Testprinzip des TGF β_1 -ELISA

2.2.8 Untersuchung der Adhäsion von IEC-6 Zellen mit Hilfe eines Enzym-Adhäsionsassay (Hexosaminidase-Adhäsionsassay)

Zur Untersuchung der Adhäsion von IEC-6 Zellen an eine Plastikmatrix oder einen mit extrazellulären Matrixfaktoren beschichteten Untergrund wurde die Umsetzung eine p-Nitrophenolderivats mit dem Enzym 2-Acetamido-2-deoxy- β -D-Glukosidacetamidodeoxuglukohydrolase (Hexosaminidase EC 3.2.1.30) bestimmt. Es handelt sich hierbei um ein ubiquitär

vorkommendes, lysosomales Enzym, welches in der Lage ist, den Abbau glykolysierter zellulärer Komponenten zu bewerkstelligen. Die Anwendbarkeit des p-Nitrophenolderivats (p-Nitrophenol-N-acetyl- β -D-Glucosamid) als Substrat für die Quantifizierung der Hexosaminidase-Enzymaktivität wurde von Banerjee und Basu 1975 gezeigt. Die weite Verbreitung dieses Enzyms macht es zu einem idealen Indikator für die Analyse von Zellzahlen, wie in dieser Form erstmalig von Kaponen et al. (1982) demonstriert. Landegren beschrieb 1984 die Untersuchung der Adhäsion verschiedener Zelllinien und Primärzellen an Zelloberflächenmoleküle unter Verwendung des Hexosaminidase-Adhäsionsassays. Unsere Untersuchungen zeigten die Anwesenheit dieses Enzyms auch in IEC-6 Zellen. In Vorversuchen wurde die lineare Beziehung zwischen der Zellzahl und der gemessenen Absorption bewiesen. Zur Adaption des Adhäsionsassays an die Versuchsbedingungen wurde zunächst eine adäquate Zellzahl und die entsprechend notwendige Adhäsionsdauer für IEC-6 Zellen bestimmt (Ergebnisteil 3.2.1). Die Adhäsionsversuche wurden in 96-well Gewebekulturplatten durchgeführt. Eine Zellzahl zwischen $1,5\text{--}2,5 \times 10^4$ Zellen und eine Adhäsionsdauer von 3 h erwiesen sich als geeignet. Zunächst wurden die beschichteten und unbeschichteten 96-well Gewebekulturplatten zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit PBS⁺-Puffer + 3% BSA für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der PBS-Puffer wurde abgesaugt, und die Zellen in einem Volumen von 50 μ l oder 100 μ l DMEM mit 0,1% FCS zur Gewebekulturplatte gegeben. Nach 3,5 h Inkubation unter Standardbedingungen bei 37 °C wurden die Zellen abgesaugt. Jede Vertiefung wurde 2 x mit 100 μ l eiskaltem PBS⁺-Puffer gewaschen. Im Anschluß wurden 60 μ l Substratlösung zu jeder Vertiefung gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 90 μ l Glycin-Puffer abgestoppt. Zur Quantifizierung wurde die Absorption bei 405 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Adhäsion wurde in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle berechnet.

2.2.9 Beschichtung von Zellkulturschalen mit extrazellulären Matrix-faktoren

Die Beschichtung von 60 mm und 90 mm Zellkulturschalen sowie von 6-, 24- und 96-well Gewebekulturschalen erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Bei dem verwendeten Fibronectin handelt es sich um ein aus humanem Plasma gewonnenen dimeren Glykoprotein. Laminin und Kollagen Typ IV wurden aus dem murinen Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor isoliert. Fibronectin und Laminin wurden in DMEM ohne Zusätze gelöst, Kollagen Typ IV in 0,05 N HCl. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Matrixfaktoren in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu den Schalen gegeben und im Anschluß bei RT für 1 h inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt, und die Zellkulturschalen oder Vertiefungen wurden mit PBS⁺-Puffer vorsichtig gewaschen. Die so beschichteten Platten konnten bei 4 °C bis zum Gebrauch, maximal eine Woche, aufbewahrt werden.

2.2.10 Untersuchungen zur Vitalität von IEC-6 Zellen

Die Untersuchung der Vitalität von IEC-6 Zellen nach Applikation von Adeninnukleotiden wurden mit drei verschiedenen Methoden untersucht. 1. IEC-6 Zellen wurden nach 24stündiger Inkubation

mit verschiedenen Adeninnukleotiden (250 μM) mit dem Farbstoff Trypanblau angefärbt (Kapitel 2.2.1). Die Anzahl toter, blau gefärbter Zellen und vitaler, farbloser Zellen wurde ermittelt und mit den erhaltenen Werten für unbehandelte IEC-6 Zellen verglichen. 2. Eine weitere Methode der Vitalitätsuntersuchung stellte eine Modifikation des MTT-Proliferationsassays dar. IEC-6 Zellen wurden in zwei parallelen 24-well Gewebekulturschalen für 72 h mit Adeninnukleotidlösungen inkubiert. Eine Gewebekulturplatte wurde zur Proliferationsbestimmung (Kapitel 2.2.6) herangezogen, die IEC-6 Zellen der zweiten 24-well Gewebekulturplatte wurden 2x mit DMEM ohne Zusätze gespült und anschließend für weitere 72 h mit Kulturmedium inkubiert. Die Proliferationsdaten dieser zweiten Platte wurde ebenfalls mit dem MTT-Assay bestimmt. Die Proliferationssteigerung nach Entfernung der Adeninnukleotidlösung wurde rechnerisch ermittelt, in Bezug zur Kontrolle gesetzt und in Prozent angegeben. 3. In einem dritten Ansatz wurde die DNA der mit Adeninnukleotiden behandelten Zellen auf DNA-Leiterbildung als ein Zeichen von Apoptose untersucht. Aufgrund der Zugehörigkeit dieser Methode zu molekularbiologischen Arbeitsweisen ist dies näher in Kapitel 2.2.24 erläutert.

B. Molekularbiologische Methoden

2.2.11 Bakterienkultur

Die von ATCC gelieferten, lyophilisierten Bakterien wurden zunächst bei 37 °C über Nacht in 6 ml LB-Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin oder 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin angezüchtet. Zur dauerhaften Lagerung wurden aus der Übernachtskultur Bakterien der stationären Phase mit 15% sterilem Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt. Zur Plasmidpräparation wurden monatlich Verdünnungsausstriche auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten angelegt.

2.2.12 Midipräparation von Plasmid-DNA

Die Midipräparation von Plasmid-DNA wurde mit dem Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die Aufreinigung basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) sowie Ish-Horowicz und Burke (1981). Im Anschluß an die alkalische Lyse folgte eine Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschersäule unter entsprechenden Salzkonzentrationen und pH-Wert-Bedingungen. Von den angelegten Verdünnungsausstrichen (2.2.10) wurde eine vereinzelte Kolonie in 5 ml LB-Medium mit Antibiotika überimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 1 ml dieser Bakteriensuspension wurde dann in 250 ml antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben. Die Inkubation erfolgte bis zu einer Optischen Dichte von 0,4 bei 600 nm (OD_{600}). Zu diesem Zeitpunkt wurde Chloramphenicol bis zu einer Endkonzentration von 170 $\mu\text{g/ml}$ zu der Kultur gegeben. Nach einer weiteren Übernachtsinkubation wurde die Bakteriensuspension 15 min bei 6000 g und 4 °C pelletiert. Die alkalische Lyse und die Säulenpräparation erfolgten nach dem Qiagen-Protokoll für langsam replizierende Plasmide. Nach Präzipitation der DNA wurde das Plasmid-DNA-Pellet in 1x TE-Puffer aufgenommen. Eine 200fache Verdünnung dieser Probe wurde zur Quantifizierung der

gewonnenen DNA-Menge im Spektralphotometer gemessen. Für hochmolekulare DNA bzw. RNA gilt: $A_{260\text{nm}} = 1$ entspricht 50 µg DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml. Das Verhältnis von $A_{260\text{nm}}$ zu $A_{280\text{nm}}$ gibt die Reinheit der Präparation wieder und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.13 DNA-Restriktion

Die Plasmid DNA wurde in den von den Herstellerfirmen angegebenen Puffersystemen verdaut. Die Bedingungen des Verdaus (Temperatur, Dauer, Zugabe von BSA) wurden nach den Empfehlungen in den Beipackzetteln gewählt.

2.2.14 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1,2%igen Agarose-Gelen in horizontalen Flachbettkammern wie von Sambrook et al. (1989) beschrieben. Bei einer Weiterverwendung der Fragmente zur Herstellung von Gensonden wurde das Gel mit einer Agarose von geringer Schmelztemperatur (Low Melting Point Agarose) verwendet. Zur Herstellung der Gele diente 0,5x TBE-Puffer. Das Gel enthielt 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr). Die DNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/6 Volumen 6x Ladungspuffer versetzt. Als Größenmarker wurde jeweils 1 µg eines molekularen DNA-Marker verwandt (Lambda DNA/EcoRI + Hind III, Lambda BstE II Digest, pBR322DNA/Alw44I Mval marker, 21, pUC19 DNA/Mspl Marker). Die Auftrennung erfolgte bei 40 mA bis 60 mM.

2.2.15 Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter Zuhilfenahme eines Skalpell mit möglichst geringem Überschuß an Agarose aus dem Low Melting Point-Agarose-Gel herausgeschnitten und in ein vorgewogenes Reaktionsgefäß gegeben. Pro Gramm Agarose wurden 3 ml destilliertes Wasser zu dem Gelstück gegeben. Die Probe wurde für 2 min auf 65 °C erhitzt. Die Gellösung wurde gemischt bis zur Homogenität und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. 25 µl dieser Probe wurden zur radioaktiven Markierung eingesetzt.

2.2.16 Radioaktive Markierung von cDNA

Die radioaktive Markierung von DNA mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP wurde mit dem Oligolabeling Kit der Fa. Pharmacia Biotech nach der "Random-prime" Methode von Feinberg und Vogelstein (1984) vorgenommen. Mit der beschriebenen Methode können zwischen 10 ng und 1 µg DNA markiert werden. Dazu wurde das interessierende DNA-Fragment aus der Plasmid-DNA mit einem

entsprechenden Restriktionsenzym herausgeschnitten und nach Auftrennung im Agarose-Gel, wie im Kapitel 2.2.14 erläutert, gewonnen. 25 µl der Gellösung mit dem gewünschten Insert wurden als "template"-DNA eingesetzt. Zunächst wurde diese für 7 min bei 95-100 °C denaturiert. Anschließend wurde zu der "template"-DNA 10 µl Reagenz-Mix mit dATP, dGTP und dNTP in gepufferter, wässriger Lösung sowie "random"-Hexameren, pipettiert. Um ein Reaktionsvolumen von 49 µl zu erhalten, wurde eine variable Menge destilliertes Wasser und 50 µCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP zu der Probe gegeben. Nach Applikation von 1 µl Klenow Enzym inkubierte die Reaktion für mindestens 2,5 h bei 37 °C. Zur Abtrennung nicht eingebauter, radioaktiver Nukleotide wurde die gesamte Probe über ProbeQuant G50 Säulen (Pharmacia Biotech) gegeben. Diese enthalten als vorequilibrierten Säuleninhalt Sephadex G-50 DNA (Grad F). Zur Feststellung der Einbaurate wurden, jeweils vor und nach dem Auftragen der radioaktiv markierten Probe auf die Säule, 2 µl entnommen und in 98 µl STE Puffer gegeben. 50 µl dieser Verdünnung wurden in Szintillationsgefäße pipettiert und im Szintillationszählgerät gemessen. Zur Berechnung der Einbaurate gilt:

$$\% \text{ Einbaurate} = \frac{\text{Anzahl der "Counts" in der Probe nach dem Auftragen auf die Säule} \times 100}{\text{Anzahl der "Counts" in der Probe nach Verlassen der Säule}}$$

Nach Überprüfung der Einbaurate konnte die radioaktiv-markierte Probe nach erneuter Denaturierung bei 95°C-100°C für die Dauer von 7 min zur Hybridisierung eingesetzt werden. Zum Beweis der gleichmäßigen Auftragung von RNA in der Northern-Hybridisierung wurde in einer zweiten Hybridisierung des gleichen Blots eine Gensonde verwandt, die als interner Standard dienen kann. Sie wurde im Gegensatz zu den weiter oben beschriebenen Gensonden für Fibronectin, Laminin $\beta 1$ und Kollagen Typ IV $\alpha 1$ nicht aus Plasmidpräparationen gewonnen, sondern kommerziell erworben. Es handelt sich hierbei um ein Plasmid mit einem Insert, das gegen die GAPDH aus der Ratte hybridisiert (Kapitel 2.1.7). Es wird bereits linearisiert geliefert und kann direkt radioaktiv markiert werden. 2 µl dieser pTRI-GAPDH-Sonde (0,5 mg/ml) wurden zunächst für 2-3 min bei 95-100 °C denaturiert und zu 31,2 µl H₂O pipettiert. Im Anschluß wurde die Markierung mit dem Oligolabeling Kit in gleicher Weise, wie für die aus Low Melting Point Agarose gewonnenen Inserts beschrieben, durchgeführt.

2.2.17 Isolation von Gesamt-RNA aus IEC-6 Zellen

Bei der Präparation von RNA wurden alle Maßnahmen ergriffen, um eine Degradierung der RNA durch Ribonukleasen zu verhindern. Hierzu gehören insbesondere die Behandlung aller Lösungen und verwendeten Geräte mit 0,1%iger Diethylpyrokarbonatlösung für die Dauer von 24 h und anschließendes Autoklavieren. Die Isolation von Gesamt-RNA aus IEC-6 Zellen wurde mit dem TRIzol Reagent der Firma Gibco durchgeführt. Das Reagenz ist eine monophasische Lösung, die aus den Hauptkomponenten Phenol und Guanidinthiocyanat besteht. Diese Einschrittmethode zur Isolation von Gesamt-RNA stellt eine Verbesserung der von Chomczynski

und Sacchi (1987) entwickelten Methode dar. Die Isolation folgte den Anleitungen des Herstellers. Zur Isolation dienten zwischen vier und zehn 100 mm Zellkulturschalen, je nach Konfluenzgrad der IEC-6 Zellen. Zur Minimierung von Degradationsprozessen wurden die Monolayer auf Eis gestellt. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden 3x mit eiskaltem PBS⁺-Puffer gewaschen. TRIzol wurde unter Beachtung der angegebenen Vorsichtsmaßnahmen zu den Zellkulturschalen gegeben. Unter Zuhilfenahme eines Zellschabers wurden die Zellen vom Untergrund abgelöst und anschließend in der TRIzol-Lösung mehrfach auf- und abpipettiert. Die Proben wurden in Reaktionsgefäße überführt und mit Chloroform versetzt. Während der folgenden Zentrifugation trennte sich die Suspension in zwei Phasen, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthielt. Die anschließende Gewinnung der RNA wurde durch Präzipitation mit Isopropanol erreicht. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das RNA-Pellet einmal mit 75%igem Ethanol gewaschen. Überschüssiges Ethanol wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, und das Pellet wurde luftgetrocknet. Das Pellet wurde je nach weiterer Verwendung in 1x TE-Puffer (mRNA-Isolation) oder Formamid (Northern Blot) gelöst und bei -80 °C aufbewahrt. Die quantitative Bestimmung erfolgte photometrisch, wie in Kapitel 2.2.11 erläutert.

2.2.18 Gewinnung von mRNA aus Gesamt-RNA

Die Aufreinigung von mRNA aus IEC-6 Zellen wurde mit dem mRNA Purification Kit der Firma Pharmacia Biotech durchgeführt. Der Gewinnung liegt das Prinzip der Bindung polyadenylierter mRNA an Oligo(dT)-Zellulose zugrunde (Sambrook et al. 1989). Die Präparation wurde nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Nach Equilibrierung der Säulen mit Puffer hoher Salzkonzentration (High Salt Puffer) wurde die in 1x TE-Puffer gelöste Gesamt-RNA aus IEC-6 Zellen zunächst denaturiert, mit Probenpuffer versetzt, und dann auf die Oligo(dT)-Säulen gegeben. Ungebundene RNA wurde in mehreren Schritten mit High Salt und Low Salt Puffer von der Säule gewaschen. Die gebundene polyadenylierte RNA wurde in vier aufeinanderfolgenden Schritten mit warmem Elutionspuffer von der Säule zurückgewonnen. Nach Zugabe von Probenpuffer wurde die mRNA mit Glykogen und eiskaltem Ethanol über Nacht präzipitiert. Nach der Zentrifugation wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet, in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.19 Auftrennung von RNA im Formaldehydgel

Die Auftrennung von mRNA aus IEC-6 Zellen wurde in einem 1%igen Agarosegel mit einer Formaldehydkonzentration von 0,98 M nach einer von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Agarose wurde je nach Gelkammergröße in entsprechender Menge Wasser erhitzt und anschließend mit 5x Laufpuffer und Formaldehyd versetzt. Zu der Gellösung wurden 0,5 µg/ml EtBr gegeben, und das Gel wurde in ein Geltablett gegossen. Nach kompletter Aushärtung wurden der Kamm und die Randbegrenzungen entfernt, und das Gel wurde in eine horizontale Gelelektrophoresekammer mit 1x Formaldehydgellaufpuffer gegeben. Zwischen 1

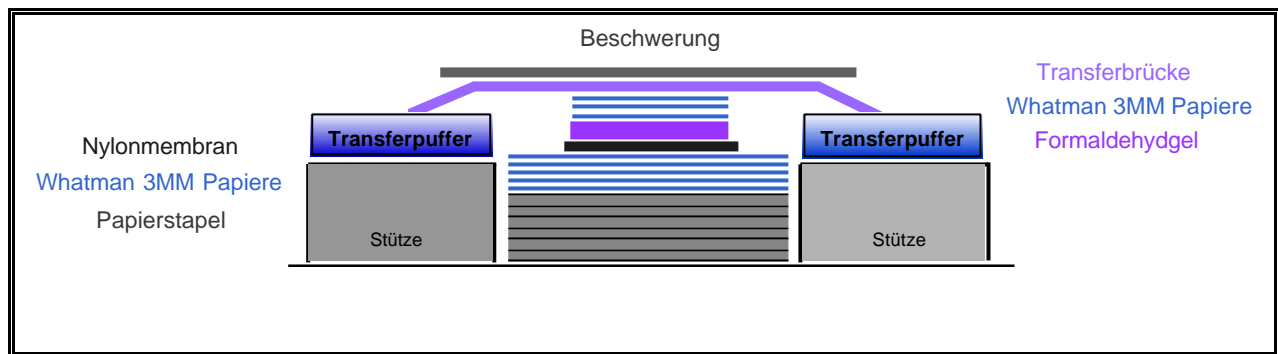
und 4 µg mRNA in 18 µl deionisiertem Formamid wurden mit 3,5 µl Formaldehydlösung (12,3 M) versetzt. Im Anschluß an eine 15minütige Denaturierung bei 65 °C wurden die Proben auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 2 µl Gelladungspuffer wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 70 Volt für eine Dauer von 2-2,5 h. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die Orientierung des Gels markiert. Die Intaktheit der 18S und 28S RNA-Banden wurden unter UV-Licht überprüft. Zum Transfer der aufgetrennten RNA auf Nylonmembranen wurde das Gel für 30-45 min in 1x Gellaufpuffer geschwenkt, um störendes Formaldehyd zu entfernen.

2.2.20 RNA-Transfer auf Nylonmembranen

Der Transfer von mRNA auf Nylonmembranen erfolgte nach dem Prinzip des "Downward Alkaline Capillary Transfer" (Chomczynski, 1992). Im Gegensatz zu der von Southern entwickelten Methode resultieren hierbei die Kapillarkräfte nicht in einem aufwärts-, sondern einem abwärtsgerichteten Fluß. Ein weiterer Unterschied zu der ursprünglichen Methode ist die Verwendung alkalischer statt neutraler Transferlösung. **Abbildung 5** veranschaulicht schematisch den Blotaufbau. Auf einen saugfähigen Papierstapel wurden vier trockene und zuoberst ein mit Transferpuffer befeuchtetes Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt. Darauf wurde die zuvor für 30 min in Wasser geschwenkte Nylonmembran (HybondN, Amersham-Buchler), die 2-3 mm größer sein sollte als das Formaldehydgel, plaziert. Auf die Membran wurde, mit der glatten Unterseite zur Membran gerichtet, luftblasenfrei das gut gewässerte Formaldehydgel gelegt, welches wiederum von 3 gleich großen in Transferpuffer angefeuchteten Filterpapieren bedeckt wurde. Über diesen befand sich eine ebenso in Transferpuffer getränkte Filterpapierbrücke. Diese bildet, anders als bei Chomczynski beschrieben, die Verbindung zu zwei Transferpufferreservoirs. Die Verwendung von zwei Reservoirs soll nach Koetsier et al. (1993) eine gleichmäßigere und effektivere Übertragung der RNA auf die Membran gewährleisten. Als Abschluß der Blotapparatur wurde zur Beschwerung eine Glasscheibe auf die Filterpapierbrücke gelegt. Die Transferdauer betrug je nach Dicke des Gel 3,5-4 h. Nach Abbau der Blotapparatur wurde die Orientierung der Membran gekennzeichnet. Im Anschluß an die Neutralisation der Nylonmembran für 5-10 min in 0,2 N Phosphatpuffer wurde diese für 30 min bei 80 °C gebacken und im UV-Crosslinker bestrahlt, um die Immobilisierung der RNA zu gewährleisten. Eine Färbung der Membran mit Methylenblau für 45 sec erlaubte die Markierung der 18S und 28S RNA bei Auftragung von Gesamt-RNA, bzw. eine Kennzeichnung der Banden des RNA-Markers bei Auftragung von mRNA zur späteren Größenorientierung.

Abbildung 5: Schematische Darstellung des "Alkaline Downward Blot" zum Transfer von RNA auf Nylonmembranen





2.2.21 Radioaktiver Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen (Northern-Analyse)

Zum Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen auf Nylonmembranen, die für Fibronectin, Kollagen IV α 1 und Laminin B1 kodieren, wurden cDNA-Sonden aus isolierter Plasmid-DNA verwandt (Kapitel 2.2.11-2.2.15). Die Überprüfung der gleichmäßigen RNA-Auftragung im Formaldehydgel wurde in einer zweiten Hybridisierung des gleichen Blots mit einer kommerziell erworbenen Sonde, die GAPDH detektiert, vorgenommen. Sie diente als interner Standard der Genexpression. Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Nylonmembranen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurden in Hybridisierungsröhrchen in einem Hybridisierungsrollofen (HYBAID Mini 10, MWG Biotech) durchgeführt. Die Nylonmembranen mit der gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA wurden hierfür mit der Oberseite nach innen gerichtet, zunächst für mindestens 6 h bei 42 °C prähybridisiert. Die Prähybridisierungslösung wurde abgegossen und durch die gleiche Menge Hybridisierungslösung ersetzt. Die radioaktiv markierte Sonde (Kapitel 2.2.16) wurde mit 1 ml der Hybridisierungslösung gemischt und zu der Nylonmembran gegeben. Die Hybridisierungsbedingungen wie Dauer, Temperatur, die anschließenden Waschmodalitäten und die Expositionsdauer der verschiedenen cDNA-Sonden können der folgenden Tabelle entnommen werden. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde die radioaktive Hybridisierungslösung entsorgt. Die Nylonmembran wurde kurz auf einem Filterpapier getrocknet und dann, eingewickelt in Klarsichtfolie, in eine Filmentwicklungs-kassette gelegt. Die mit radioaktiv markierten Sonden hybridisierten Nylonmembranen wurden mit einem Kodak Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) und einer Verstärkerfolie für die Dauer von 1 h bis zu einer 72 h bei -80 °C exponiert (**Tabelle 2**). Zur Zweithybridisierung wurden die Nylonmembranen mit einer 100 °C heißen Waschlösung (0,1% SSC, 0,1%SDS) übergossen und 30 min auf dem Schüttler geschwenkt. Nach Trocknung auf einem Filterpapier standen sie erneut zur Rehybridisierung zur Verfügung.

Tabelle 2: Hybridisierungsbedingungen und Waschmodalitäten der verwendeten cDNA Sonden

cDNA Sonde	pTRI-GAPDH	Fibronectin	Kollagen IV α 1	Laminin b 1

Prähybridisierung	42 °C - 6 h	42 °C - 6 h	42 °C - 6 h	42 °C - 6 h
Hybridisierung	42 °C - 20 h	42 °C - 24 h	42 °C - 19 h	42 °C - 21 h
1. Waschung	30°C - 5 min - 2x SSC	RT - 5 min - 2x SSC	30°C - 5 min - 2x SSC	24°C - 5 min - 2x SSC
2. Waschung	30°C - 5 min - 2x SSC	RT - 5 min - 2x SSC	30°C - 5 min - 2x SSC	24°C - 5 min - 2x SSC
3. Waschung	60 °C - 30 min 2x SSC, 0,1 % SDS	60 °C - 30 min 2x SSC, 0,1 % SDS	45 °C - 30 min 2x SSC, 0,1 % SDS	60 °C - 30 min 2x SSC, 0,1 % SDS
Fimexposition (h)	1	72	48	24

2.2.22 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA wurde mit einem Kit der Firma Maxim Biotech durchgeführt. Zwischen 1 und 2 µg mRNA wurden zur Transkription eingesetzt. Neben den zu untersuchenden Proben wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Enzym mitgeführt. Diese Negativkontrolle ermöglichte in der anschließenden PCR den Nachweis, daß nur neu synthetisierte cDNA, nicht aber genomische DNA amplifiziert wurde. Die mRNA wurde in einem Volumen von 14,5 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Oligo(dT)-Moleküle (Sambrook et al., 1989), die mit dem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der mRNA-Matrize hybridisieren, wurden als Startermoleküle eingesetzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 70 °C wurden 31,5 µl des Ansatzes, bestehend aus einem RNase-Inhibitor, einem dNTP-Mix (1mM für jedes dNTP), dem im Kit enthaltenden 5x Puffer und der reversen Transkriptase des MMLV (recombinant Moloney Murine Leukemia Virus) zur mRNA pipettiert. Zu der Negativkontrolle wurden alle Komponenten mit Ausnahme der reversen Transkriptase gegeben. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 1 h bei 42 °C und anschließend für 10 min bei 95 °C inkubiert. Er konnte anschließend bei -20 °C aufbewahrt werden. 2 µl dieses Ansatzes wurden in der folgenden PCR-Reaktion eingesetzt.

2.2.23 Multiplex-PCR zum semiquantitativen Nachweis der TGFβ - Expression

Zum Nachweis der Expression von TGFβ wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt. Die verwendeten, rattenspezifischen Primersequenzen zur Amplifikation von TGFβ₁ und GAPDH und die Größen der resultierenden Produkte können der **Tabelle 3** entnommen werden. 2 µl des Reaktionsansatzes aus der reversen Transkription wurden für jede PCR-Reaktion eingesetzt. Jeweils 48 µl des vorpipettierten Master-Mixes, der DEPC-H₂O, 10x PCR Puffer mit MgCl₂, dNTPs, GAPDH-Primer, TGFβ-Primer und die Amplitaq Polymerase enthielt, wurden zu der cDNA pipettiert, so daß sich folgende Endkonzentrationen ergaben: MgCl₂: 1,5 mM; dNTPs: 0,25 mM; GAPDH-Primer: 0,05 µM; TGFβ-Primer: 0,2 µM; Amplitaq-Polymerase 0,04 U/µl. Das Gesamtvolumen jedes Reaktionsansatzes betrug 50 µl. Mit jedem Versuchsansatz wurde eine Negativkontrolle ohne DNA, eine Negativkontrolle ohne reverse Transkription und eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Proben wurden direkt vom Eis in den auf 94 °C vorgeheizten Thermocycler (GeneAmp 9600, Perkin Elmer) gegeben und für 10 min denaturiert. 25 Reaktionszyklen wurden durchlaufen, wobei sich jeder Zyklus aus 1 min Denaturierung bei 94

°C, 1 min Abkühlung bei 54 °C und 2 min Primer-Verlängerung bei 72 °C zusammensetzte (verändert nach Li et al. , 1997). Die Proben wurden nach dem letzten Zyklus auf 4 °C abgekühlt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem 1,2%igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel mit den visualisierten DNA-Banden unter dem UV-Schirm photographiert.

Tabelle 3: Übersicht über verwendete PCR-Primer

cDNA + Primer	Position in der Gensequenz	Primersequenz	Größe des Amplifikats
vorwärts GAPDH	439-458	5' AAT GCA TCC TGC ACC ACC AA 3'	516 Bp
rückwärts	954-934	5' GTA GCC ATA TTC ATT GTC ATA 3'	
vorwärts TGFβ1	1267-1291	5' C TTC AGC TCC ACA GAG AAG AAC TGC 3'	298 Bp
rückwärts	1564-1540	5' CAC GAT CAT GTT GGA CAA CTG CTC C 3'	

2.2.24 Untersuchung der DNA von IEC-6 Zellen auf DNA-Leiterbildung als ein Zeichen von Apoptose-Vorgängen

Als ein Zeichen von Apoptosevorgängen in Zellen gilt die Degradation von DNA, die sich in einem Agarosegel als charakteristische DNA-Leiterbildung darstellt. Zur Untersuchung, ob es nach der Applikation von Adeninnukleotiden zu einer DNA-Leiterbildung kommt, wurde das "Apoptotic DNA Ladder Kit" der Firma Boehringer Mannheim verwandt. IEC-6 Zellen wurden nach 72stündiger Inkubation mit verschiedenen Adeninnukleotiden trypsiniert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse der Zellen wurde mit im Kit enthaltenem Lysepuffer durchgeführt. Die Isolation der DNA erfolgte nach dem Prinzip der Bindung von Nukleinsäuren an die Oberfläche von Glasfasern in Gegenwart eines chaotropen Salzes. Nach Elution wurden 20 µl der DNA-Lösung mit 5 µl Ladungspuffer gemischt und auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Als Vergleich diente die DNA apoptotischer U937 Zellen.

2.2.25 Untersuchungen zur Aktivierung der MAP-Kinase in IEC-6 Zellen

Zur Untersuchung, ob es nach Applikation von Adeninnukleotiden oder Adeninukleotidagonisten zu einer Aktivierung der MAP-Kinase kommt, wurde eine Versuchsanleitung gewählt, die sich die Fähigkeit der MAP-Kinase das Myelinbasisprotein (myelin basic protein, MBP) zu phosphorylieren, zunutze macht (Alessi et al., 1995). Definitionsgemäß entspricht 1 Einheit Aktivität (1 U) der Menge Enzym, die in der Lage ist, 1 nmol Phosphat in 1 min in das MBP zu inkorporieren. Bis zu einem Wert von 6 U/ml ist der Wert für die MAP-Kinase- Messung linear.

Als Bezugsgröße für die ermittelten Werte diene eine Proteinbestimmung nach Bradford et al. (1976). Subkonfluente IEC-6 Zellen wurden für eine Dauer von 5 min mit 250 μM ADP, ATP oder $\beta\gamma\text{MeATP}$ inkubiert. Als Kontrolle diene die Zugabe des Mediums, in dem die Adeninnukleotide gelöst worden waren, ohne Zusätze. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS⁻-Puffer (ohne MgCl_2 und Ca^{2+}) gespült. Anschließend wurden 500 μl Lysepuffer mit entsprechenden Proteinaseinhibitoren (siehe Material) zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst und das Zellysate in Reaktionsgefäße überführt. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand in 100 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Proteinbestimmung und MAP-Kinase Messung wurden die Proben langsam aufgetaut. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford et al. bestimmt. Die eingesetzte Konzentration für die MAP-Kinase-Bestimmung sollte zwischen 0,5 und 2 μg Protein liegen. Für jede zu untersuchende Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Parallel zu den Proben wurde in Doppelbestimmung zum einen der MBP-Wert gemessen, der die spontane Phosphorylierung von MBP ohne Anwesenheit des Zellysats wiedergibt und zum zweiten der Probenleerwert, der kein MBP enthält und somit die von MBP unabhängige Phosphorylierungen im Zellysate mißt und 3. der reine Leerwert ohne MBP und Probe, der zur Berechnung des Probenwertes von 2 subtrahiert werden muß. Zudem wird zur Kalkulation die Menge an eingesetzten Counts in der Probe benötigt. Dazu wird die entsprechende Menge der ATP-Lösung im γ -Counter gemessen. Eine Übersicht über das Pipettierschema liefert **Tabelle 4**. Der zugegebene PKI (Protein kinase inhibitor) ist ein spezieller Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Die Reaktion wurde mit Zugabe der radioaktiven $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP-Lösung gestartet. Die Reaktion wurde bei 30°C für die Dauer von 10 min durchgeführt und anschließend mit 10 μl eiskalter TCA gestoppt.

Tabelle 4: Pipettierschema der MAP-Kinase Messungen

Probenwert	Probenleerwert	Leerwert	MPB-Wert	ATP-Totalwert
10 μl Probe	10 μl Probe	10 μl Lysispuffer	10 μl Lysispuffer	990 μl H ₂ O
10 μl PKI/MgCl ₂	10 μl PKI/MgCl ₂	10 μl PKI/MgCl ₂	10 μl PKI/MgCl ₂	
10 μl MBP Lösung	10 μl H ₂ O	10 μl H ₂ O	10 μl MBP Lösung	

Jeweils 25 μl der Ansätze wurden auf Phosphocellulose-Papiere (P81, Whatman) gegeben. Diese sind in der Lage das MBP, nicht aber das ATP zu binden. Nach Fixierung mit 0,5%iger Phosphorsäure und dreimaligem Waschen, um eventuell vorhandene ATP-Reste vollständig zu entfernen, wurden die Phosphocellulose-Papiere getrocknet. Anschließend wurden sie in Szintillationsröhrchen überführt. Jede Probe wurde im γ -Counter für die Dauer von 5 min gemessen. Zur Berechnung der erhaltenen Werte wurden zunächst die Counts der Dreifachbestimmungen gemittelt. Von diesen wurden jeweils die gemessenen Counts des Probenleerwerts und des MBP-Wertes subtrahiert und der im Probenleerwert enthaltene Leerwert addiert. Die errechneten Counts wurden mit der Verdünnung der MBP-Lösung multipliziert und die Gesamtzahl der eingesetzten Counts dividiert. Der erhaltene Wert in

pmol/min mußte dann auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen werden, um einen Vergleich der Proben untereinander vorzunehmen. Die im Ergebnisteil angegebenen Werte sind pmol/mg/min.

2.2.26 Statistische Meßmethoden

Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts. Die Berechnung zweiseitiger Signifikanzniveaus mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$, signifikant) kleiner 1% ($p < 0,01$, eindeutig signifikant) und kleiner 0,1% ($p < 0,001$, hoch signifikant) erfolgte mit dem heteroskedastischen T-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen und einer Varianzanalyse. Bei nicht eindeutiger Signifikanz ($p > 0,01$) im T-Test wurde zusätzlich ein nicht parametrischer Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Die statistischen Auswertungen wurden mit den Computerprogrammen Excel 7.0 und GB-STAT für Windows 95 auf einen IBM-Computer durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Modulation intestinaler Wundheilungsvorgänge durch Adeninnukleotide *in vitro*

3.1.1 Effekte ausgewählter Adeninnukleotide auf die Migration von intestinalen Epithelzellen (IEC-6) der Ratte

Es ist weithin anerkannt, daß Adeninnukleotide eine Vielzahl von Wirkungen auf unterschiedliche Gewebe und Zelltypen ausüben (Dubyak & El-Moatassim, 1993). ATP genießt aufgrund seiner ubiquitären Verbreitung eine besondere Stellung unter den Adeninnukleotiden. Entscheidend für die Bedeutung bei Wundheilungsvorgängen aber ist die Tatsache, daß es im Zusammenhang mit Verletzungen zu hohen ATP-Konzentrationen im extrazellulären Bereich kommt. ATP ist in millimolaren Konzentrationen (3-5 mM) im Cytosol aller Zelltypen vertreten (Dubyak & El-Moatassim, 1993). Obwohl extrazelluläre ATP-Level aufgrund der geringen Passierbarkeit der Membran für ATP und MgATP und der Anwesenheit von EktoATPasen normalerweise gering sind, kommt es im Zuge physiologischer und pathologischer Vorgänge wie dem Tod oder Untergang umgebender Zellen zu vorübergehend hohen Konzentrationen extrazellulären ATPs (Gordon, 1986). Zudem gibt es bereits Hinweise, daß die Wundheilung durch Adeninnukleotide moduliert werden kann. So stimulieren hydrolysierbare und nicht-hydrolysierbare ATP-Formen die Wundheilung in Nierenepithelzellen aus dem Schwein (LLC-PK-1) und dem Kaninchen (MDCK) *in vitro* (Sponsel et al., 1995). Auch die Migration von nicht-transformierten Nierenepithelzellen aus Meerkatzen (BSC-1) wird in einem *In vitro* Wundheilungsmodell durch Adeninnukleotide gefördert (Kantha et al., 1992a). Zudem haben sich Adeninnukleotide in *In vivo* Experimenten als wirksame Stimulatoren von Wundheilungsvorgängen erwiesen. Sie waren in der Lage, experimentell den Zustand nach ischämischer oder toxischer Nierenschädigung in Rattenmodellen zu verbessern (Paller et al., 1998) und auch die Infusion von Adeninnukleotiden in Ratten mit akutem Nierenversagen bewirkte eine schnellere Regeneration als bei den Kontrolltieren (Toback, 1992). Diese Daten geben Anlaß zu der Vermutung, daß auch intestinale Reparaturvorgänge von Adeninnukleotiden beeinflusst werden könnten. Es erscheint daher sinnvoll, die Wirkungen verschiedener Adeninnukleotide auf intestinale epitheliale Restitution zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Effekte von Adeninnukleotiden auf die intestinale epitheliale Restitution wurde ein Wundheilungsmodell mit nicht-transformierten Rattendünndarm-Epithelzellen gewählt. Diese als IEC-6 (Intestinale Epithelial Cell line no 6) bezeichnete Zelllinie wurde 1979 von Quaroni et al. isoliert und charakterisiert. Diese Arbeitsgruppe konnte schlüssig belegen, daß es sich bei der von ihnen entwickelten Zelllinie um nicht transformierte Zellen handelt. So besitzen IEC-6 Zellen einen diploiden, normalen Rattenkaryotyp, ohne genetische Heterogenität zwischen einzelnen Zellen. Ihre Lebensdauer *in vitro* ist begrenzt, und sie weisen eine konstante Sättigungsdichte in der Kultur auf. Ferner sind sie nicht in der Lage, Kolonien in Softagar zu bilden oder aber bei Injektion in andere Lebewesen Tumoren zu induzieren (Quaroni et al., 1979). Zur ConcanavalinA(ConA)-Agglutination kommt es nur in Anwesenheit von Lektinen bei hohen ConA-Konzentrationen (Weiser 1973, Podolsky & Weiser, 1973). Nicht nur der Umstand, daß es sich um nicht-transformierte Zellen handelt, sondern auch die Tatsache, daß IEC-6

Zellen eine große Anzahl von Gemeinsamkeiten mit den Rattendünndarm-Epithelzellen der Krypten besitzen, belegt ihre Eignung für die Untersuchung intestinaler Restitutionsvorgänge. IEC-6 Zellen unterscheiden sich von ausdifferenzierten Villuszellen durch fehlende alkalische Phosphatase-Aktivität und das Nichtvorhandensein des Isomaltase-Sucrase-Komplexes. Obwohl sie diese Eigenschaften eines ausgereiften Enterozyten nicht besitzen, ist ihnen dennoch die Fähigkeit zur partiellen Differenzierung nicht verloren gegangen. So kommt es 18 h nach Applikation von TGF β (25 pM) zu einer Induktion der Sucrase-Aktivität in IEC-6 Zellen (Kurokawa et al., 1987). Die vorliegenden Untersuchungen an Rattendünndarm-Epithelzellen durchzuführen, machte nicht zuletzt die Tatsache notwendig, daß es bisher nicht gelungen ist, humane primäre intestinale Epithelzellen dauerhaft in Kultur zu nehmen.

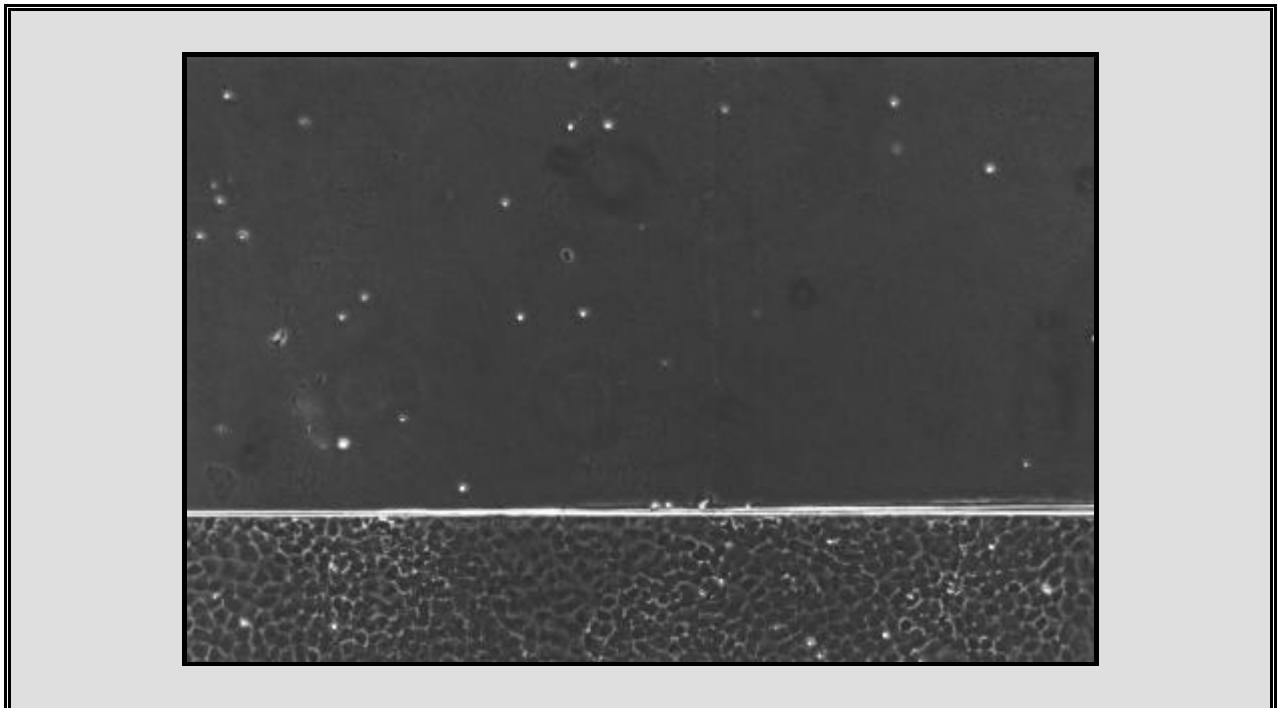


Abbildung 6: Untersuchung der Wundheilung bei IEC-6 Zellen mit Hilfe eines *In vitro* Wundheilungsmodells

Zur Untersuchung der Wundheilung bei IEC-6 Zellen wurden konfluente Monolayer mit sterilen Rasierklingen verletzt. Die Fotografie zeigt das mikroskopische Bild des Wundrandes in 100facher Vergrößerung direkt im Anschluß an die durchgeführte Verletzung. Deutlich tritt die Begrenzung des Monolayers zur Wunde hin als weißer Strich hervor. Die Migration bzw. epitheliale Restitution setzt direkt nach der Verwundung in den Wunddefekt hinein ein.

Die Untersuchung von Wundheilungsvorgängen an IEC-6 Zellen stellt zudem eines der am besten charakterisierten *In vitro* Systeme dar (McCormack, 1992; Dignass et al., 1993, 1994a und b). So ist das vorliegende Modell der epithelialen Restitution zwar stark vereinfacht, bietet aber dennoch gegenüber *In vivo* Modellen einige entscheidende Vorteile. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, daß die Untersuchungen ausschließlich an Epithelzellen durchgeführt werden können, während bei einer *In vivo* Präparation Verunreinigungen mit nicht-epithelialen Zellbestandteilen, wie Fibroblasten und Lymphozyten, zu berücksichtigen wären. Da die verschiedenen Zellpopulationen des intestinalen Epithels durch eine Vielzahl von Zytokinen miteinander vernetzt sind, käme es bei der Untersuchung von Wundheilungsvorgängen zu

unkalkulierbaren Wechselwirkungen. Dagegen erlauben in Zellkultur durchgeführte Experimente standardisierte Bedingungen. Verwendete Medien und Kulturbedingungen sowie die Zugabe definierter Mengen einer zu untersuchenden Substanz können leicht und beliebig oft reproduziert werden. Sowohl die exakte Quantifizierung der Migration und Proliferation, den initialen Phasen der epithelialen Wundheilung, durch fotografische und kolorimetrische Meßmethoden, als auch die beliebig häufige Wiederholbarkeit der Versuchsanordnungen stellen einen entscheidenden Vorteil gegenüber *In vivo* Modellen dar.

Zum besseren Verständnis des *In vitro* Wundheilungsmodell ist in **Abbildung 6** der Zustand des verletzten Monolayers direkt nach Etablierung der Wunde gezeigt. Deutlich zu erkennen ist die scharfe Abgrenzung des IEC-6 Monolayers zum Wunddefekt hin. Die Migration der Epithelzellen in den Wunddefekt hinein konnte nach 3-4 Stunden beobachtet werden. Unterschiede zwischen restitutionsfördernden und -hemmenden Substanzen waren bei mikroskopischer Betrachtung etwa nach 12-16 Stunden erkennbar. Zur Vereinheitlichung der Untersuchungsmethode und zur Quantifizierung der migrierten Zellen wurden 24 Stunden nach Etablierung der Wunden Fotos von den zuvor als geeignet markierten Stellen angefertigt. Die Auszählung der eingewanderten Zellen wurde anschließend anhand der Photographien durchgeführt. In jedem Versuchsansatz wurden neben den zu untersuchenden Substanzen auch Kontrollplatten mitgeführt, die als Maßstab für die Migration dienten.

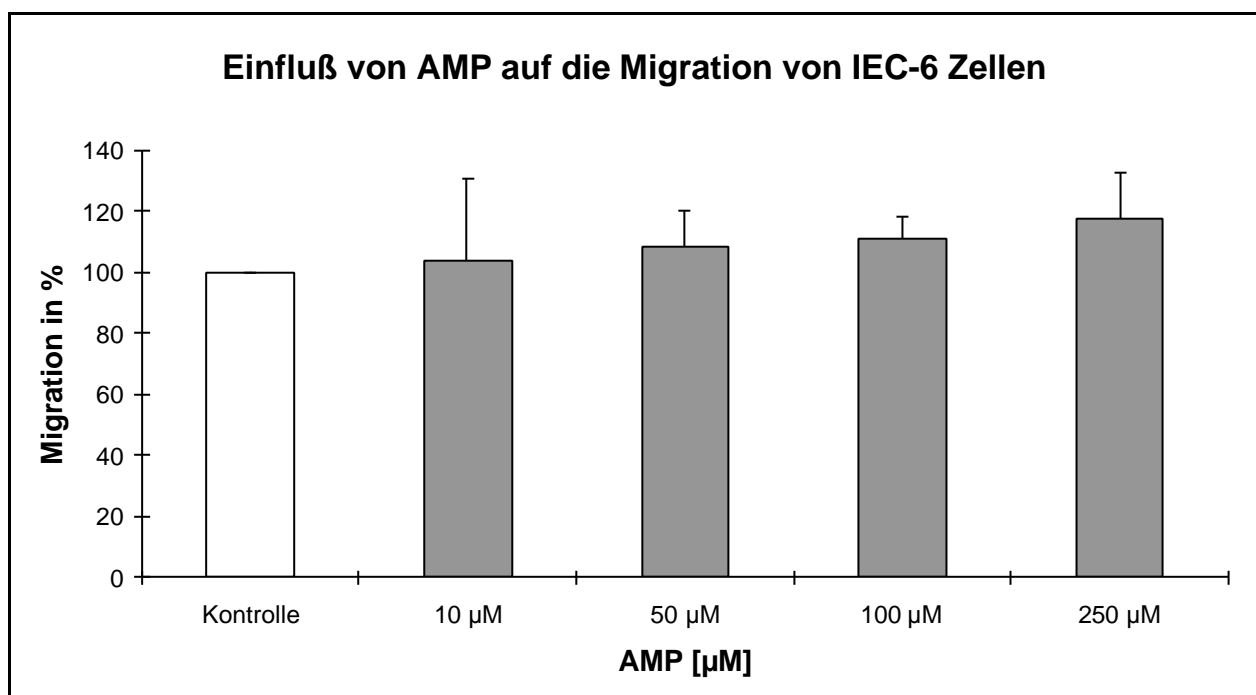


Abbildung 7: *Einfluß verschiedener Konzentrationen des Adeninnukleotids AMP auf die Migration von IEC-6 Zellen. In konfluenten IEC-6 Monolayern wurden mit sterilen Rasierklingen zwei bis drei Wunden erzeugt. Die Migration wurde an markierten Stellen 24 h später fotografisch quantifiziert. Den Daten liegen mindestens sechsfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.*

Jede Versuchssubstanz wurde gleichzeitig auf mehrere Platten gegeben, um bei der Auswertung einen Mittelwert zwischen verschiedenen Einzelplatten berechnen zu können.

Abbildung 7 zeigt die Untersuchung zum Einfluß von AMP auf die epitheliale Restitution von IEC-6 Zellen. Die untersuchten Konzentrationen zwischen 10 und 250 μM AMP bewirkten keine signifikante Veränderung des Migrationsverhaltens der Zellen. Alle Werte wurden auf die Kontrolle bezogen, deren Wert als 100% Migration definiert wurde. Die ermittelten Migrationsdaten zeigen eine leicht ansteigende Tendenz von der niedrigsten zur höchsten untersuchten AMP-Konzentration (10 μM : 103,7%; 250 μM : 117,3%), dennoch handelt es sich nicht um signifikante Unterschiede.

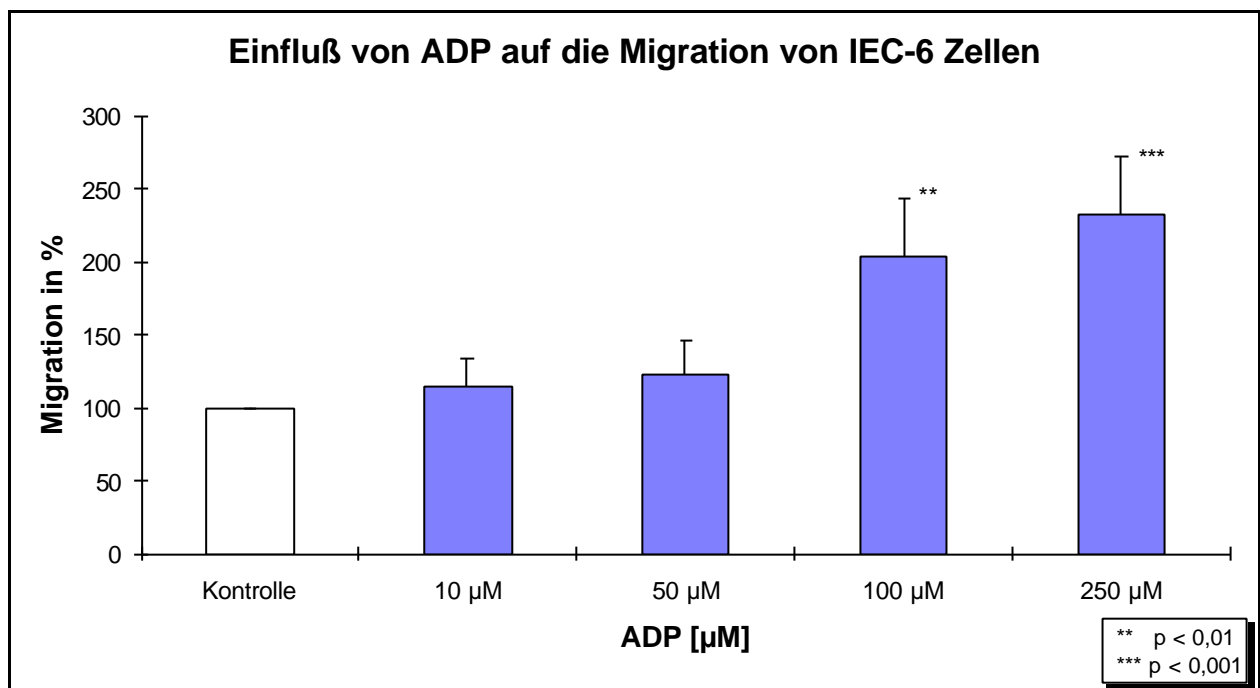


Abbildung 8: Einfluß verschiedener Konzentrationen des Adeninnukleotids ADP auf die Migration von IEC-6 Zellen. In konfluenten IEC-6 Monolayern wurden mit sterilen Rasierklingen zwei bis drei Wunden erzeugt. Die Migration wurde an markierten Stellen 24 h später photographisch quantifiziert. Den Daten liegen mindestens sechsfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Andere Ergebnisse ergab die Untersuchung der epithelialen Restitution von IEC-6 Zellen unter Einfluß von ADP. **Abbildung 8** zeigt die Migration bei steigenden Konzentrationen dieses Adenninukleotids. So führte ADP zu einer dosisabhängigen Stimulation der epithelialen Restitution bei IEC-6 Zellen im *In vitro* Wundheilungsmodell. Während die Migrationsdaten für 10 μM und 50 μM ADP zwar erhöht (114,6%, 122,2%), aber nicht signifikant waren, zeigte 100 μM ADP eine eindeutig signifikante und 250 μM ADP eine hoch signifikante Förderung der epithelialen Restitution nach 24 Stunden.

Ähnlich verhielten sich die Ergebnisse für das Adeninnukleotid ATP. Die **Abbildungen 9A** und **9B** zeigen im Vergleich die Migration von IEC-6 Zellen in der Kontrolle (**Abbildung 9A**) und bei Zugabe von 250 μM ATP (**Abbildung 9B**). Die Photographie des mikroskopischen Bildes zeigt, wie deutlich der 24 Stunden zuvor angefertigte Wundrand zu erkennen ist.

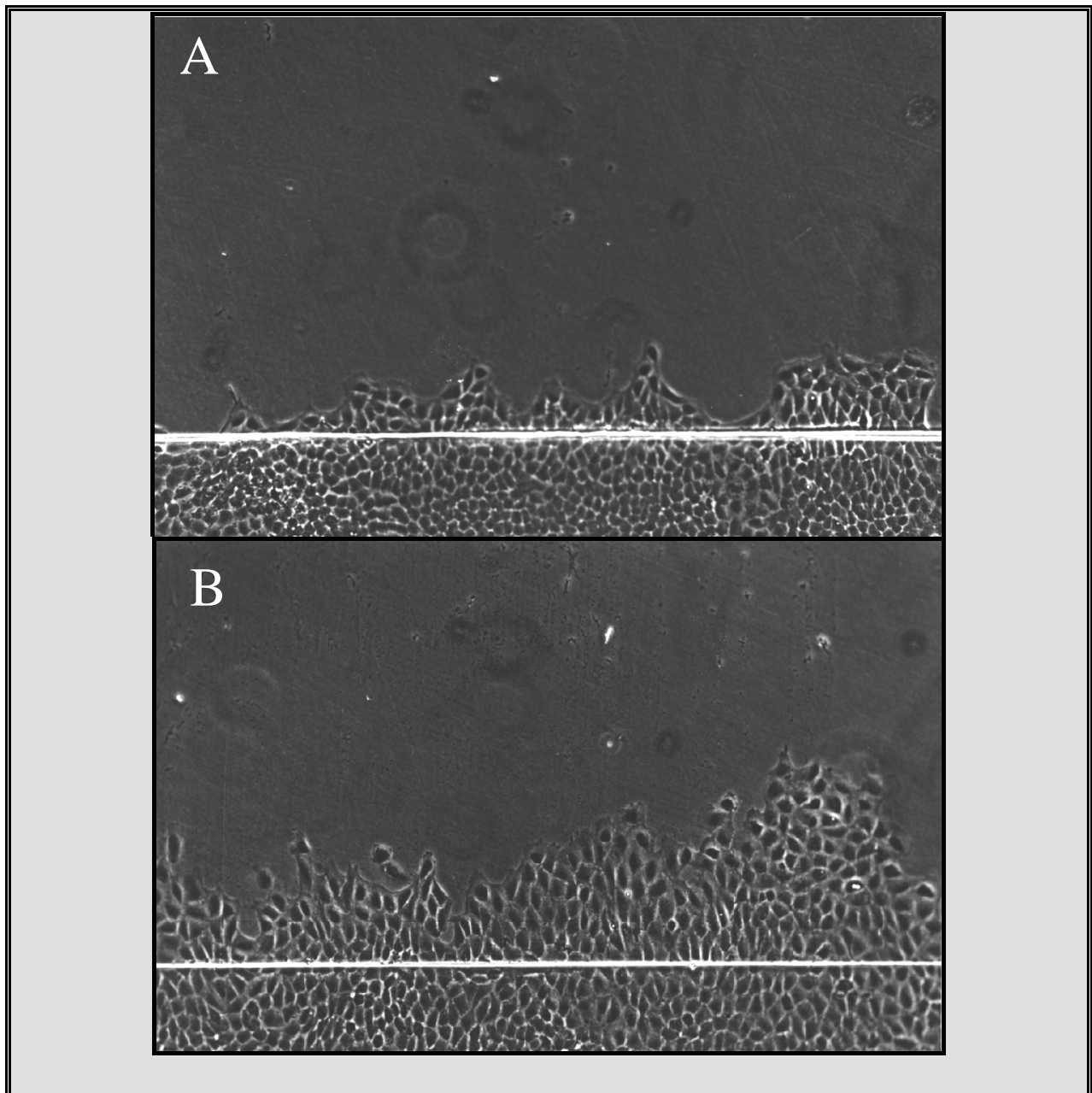


Abbildung 9: Untersuchung des Einflusses von ATP auf die epitheliale Restitution bei IEC-6 Zellen in einem In vitro Wundheilungsmodells

Die Fotografien zeigen die mikroskopischen Bilder von IEC-6 Zellen 24 h nach der Verwundung des Monolayers. Abbildung A stellt die Kontrolle da, ohne Zusatz von Substanzen im Zellkulturmedium. Den Zellen in Abbildung B wurden mit 250 μM ATP für die gleiche Dauer inkubiert. Die Fotografien wurden bei 100facher Vergrößerung angefertigt.

Die in den Wunddefekt eingewanderten Zellen erscheinen größer als die hinter dem Wundrand verbliebenen. Deutlich zu erkennen ist auch der Unterschied zwischen der Anzahl migrierter Zellen bei der Kontrolle und den mit 250 μM ATP behandelten Zellen. Die in der Fotografie erkennbaren Unterschiede gibt die Auswertung der Daten in **Abbildung 10** wieder. So führte die Applikation von ATP ab einer Konzentration von 100 μM zu einer hoch signifikanten Stimulation der epithelialen Restitution von IEC-6 Zellen.

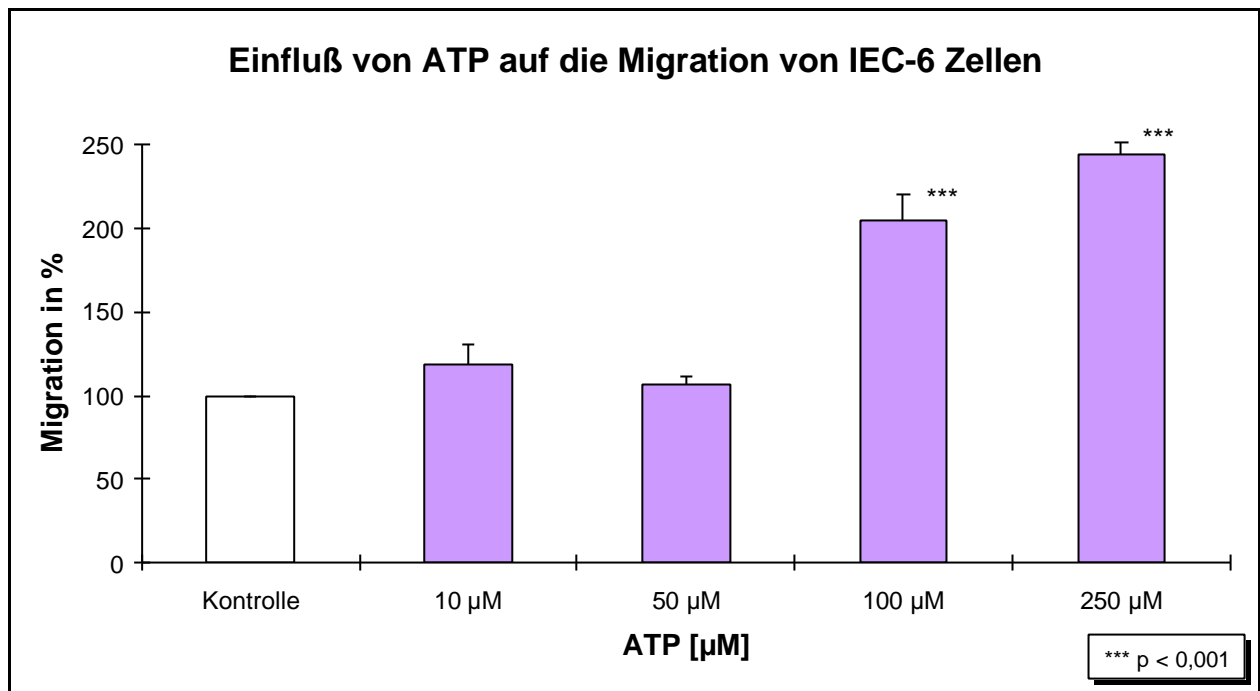


Abbildung 10: Einfluß verschiedener Konzentrationen des Adeninnukleotids ATP auf die Migration von IEC-6 Zellen. In konfluenten IEC-6 Monolayern wurden mit sterilen Rasierklingen zwei bis drei Wunden erzeugt. Die Migration wurde an markierten Stellen 24 h später photographisch quantifiziert. Den Daten liegen mindestens fünffach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Die Daten belegen eine Verdoppelung der Anzahl migrierter Zellen für 100 µM ATP und eine Steigerung auf 244,6% für 250 µM ATP. Beide Ergebnisse sind gegenüber der Kontrolle hoch signifikant. Im Vergleich zu den für ADP erzielten Ergebnissen ergab sich ein weniger gleichmäßiger Anstieg der Migrationsförderung, da bei 50 µM ATP keine Stimulation gemessen werden konnte (107,2%).

Bezogen auf die untersuchten Adeninnukleotide kann daher zusammenfassend festgehalten werden, daß AMP keine, ADP und ATP jedoch ab einer Konzentration von 100 µM eine signifikante Erhöhung der epithelialen Restitution von intestinalen Epithelzellen im *In vitro* Wundheilungsmodell bewirkten.

Es ist bekannt, daß Adeninnukleotide ihre Wirkungen über sogenannte Purinrezeptoren vermitteln können. Diese werden nach Burnstock (1978) in 2 Klassen unterteilt. Man unterscheidet hierbei P1- und P2-Rezeptoren. Ein Hauptkriterium für die Unterscheidung dieser beiden Hauptklassen ist die unterschiedliche Ansprechbarkeit auf verschiedene Adeninukleotide. So wirken an den P1-Rezeptoren AMP und Adenosin, während ADP und ATP die P2-Rezeptoren aktivieren können. Um auszuschließen, daß die beobachteten Effekte von ADP und ATP auf Degradationsprodukte zurückzuführen sind, wurden neben AMP auch cAMP und Adenosin, auf ihre Fähigkeit die IEC-6 Zellmigration zu modulieren, untersucht. Keine dieser Substanzen erwies sich als migrationsfördernd oder -hemmend. Daher ist eine P1-Rezeptor-vermittelte Migrationsstimulation nicht denkbar, vielmehr kann ein P2-Rezeptor-vermittelter Mechanismus angenommen werden.

3.1.2 Untersuchungen zur TGF β -Abhängigkeit der ADP/ATP-vermittelten Migrationsstimulation

Im folgenden sollte untersucht werden, ob die bei IEC-6 Zellen durch ADP und ATP-vermittelte Migrationsstimulation über einen TGF β -abhängigen Prozesses bewirkt wird. Diese Vermutung lag nahe, da Untersuchungen von Ciacci et al. (1993) gezeigt hatten, daß es zur signifikanten Erhöhung von TGF β Peptid in verletzten IEC-6 Monolayern kommt. Zudem konnten Dignass & Podolsky (1993) demonstrieren, daß viele Zytokine, wie z.B. Transforming Growth Factor α (TGF α), Epidermal Growth Factor (EGF), Interferon γ (IFN γ) und Interleukin 1 β (IL1 β) die epitheliale Restitution in IEC-6 Zellen über einen TGF β -abhängigen Prozeß stimulieren. In den genannten Fällen konnte die Wirkung der Zytokine durch gleichzeitige Gabe von spezifischen TGF β -Antikörpern blockiert werden. Zur Untersuchung, ob die Blockierung durch TGF β -Antikörper auch bei den restitutionsfördernden Adeninnukleotiden ADP und ATP möglich ist, wurden in einem parallelen Ansatz die Wirkungen von 250 μ M ADP und ATP allein, oder aber bei gleichzeitiger Applikation der TGF β -Antikörpern untersucht. In Vorversuchen hatte sich eine Konzentration von 30 μ g/ml des TGF β -Antikörpers als wirksam erwiesen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Abbildung 11** dargestellt. Die ermittelten Daten zeigen, daß die gleichzeitige Gabe von Anti-TGF β keine Aufhebung der Restitutionsstimulierung nach sich zog.

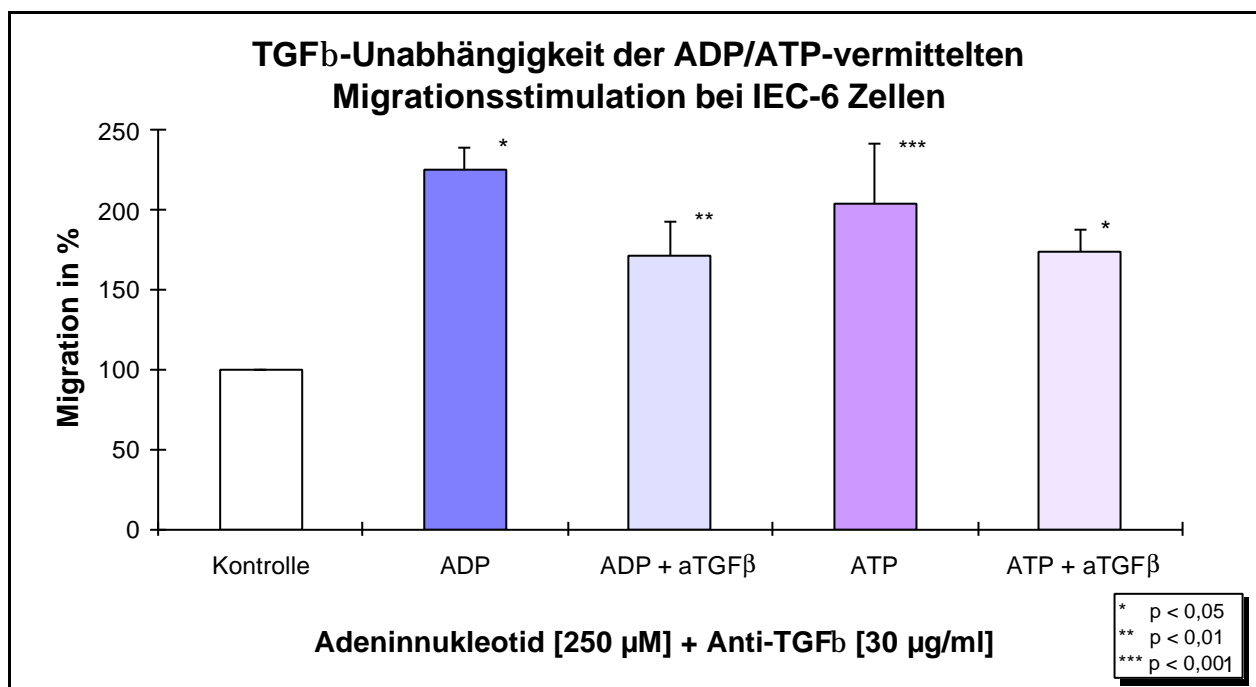


Abbildung 11: Untersuchung zur Aufhebbarkeit der ADP/ATP-vermittelten Migrationsstimulation durch die Zugabe eines blockierenden Antikörpers gegen TGF β . Die Adeninnukleotide ADP und ATP wurden in einer Konzentration von 250 μ M eingesetzt. 30 μ g/ml des Antikörpers Anti-TGF β wurden gleichzeitig zum Medium gegeben. Die konfluenten IEC-6 Monolayer wurden mit sterilen Rasierklingen an zwei bis drei Stellen "verletzt". Die Migration wurde an den markierten Stellen 24 h später photographisch quantifiziert. Den Daten liegen mindestens vierfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Die Zugabe von TGF β -Antikörpern führte zu einer Verringerung der Migration der untersuchten IEC-6 Zellen von 224,3% auf 170,5% für 250 μ M ADP und 203,7% auf 173,3% für 250 μ M ATP bezogen auf die Kontrolle. Diese Reduktion war bedingt durch die Hemmung des natürlich vorkommenden TGF β s, welches von IEC-6 Zellen konstitutiv und vermehrt nach Verwundung gebildet wird. Die Migrationsdaten bei gleichzeitiger Applikation von ADP, ATP und anti-TGF β waren signifikant gegenüber den unbehandelten Zellen erhöht. Dies läßt den Schluß zu, daß die durch ADP und ATP bewirkte Zunahme der epithelialen Migration bei IEC-6 Zellen über einen TGF β -unabhängigen Prozeß bewirkt wird.

3.1.3 Einfluß verschiedener Adeninnukleotide auf die intestinale epitheliale Zellproliferation *in vitro*

Die epitheliale Restitution besteht aus zwei distinkten Prozessen, der Migration unverletzter Zellen in den Wunddefekt und der Vermehrung der verbliebenen Epithelzellen um den Zellpool wieder zu vervollständigen (Basson et al., 1992a). Das intestinale Epithel besitzt den schnellsten Zellumsatz innerhalb des Organismus bei Säugetieren. So sind nach 24-96 Stunden alle Zellen der Mukosa des Dün- und Dickdarms erneuert (Lipkin et al., 1963). Zur Gewährleistung der Kontinuität und funktionalen Integrität des intestinalen Epithels ist eine ausgewogene Balance zwischen dem Verlust von Epithelzellen und der Erneuerung durch Proliferation und Differenzierung notwendig.

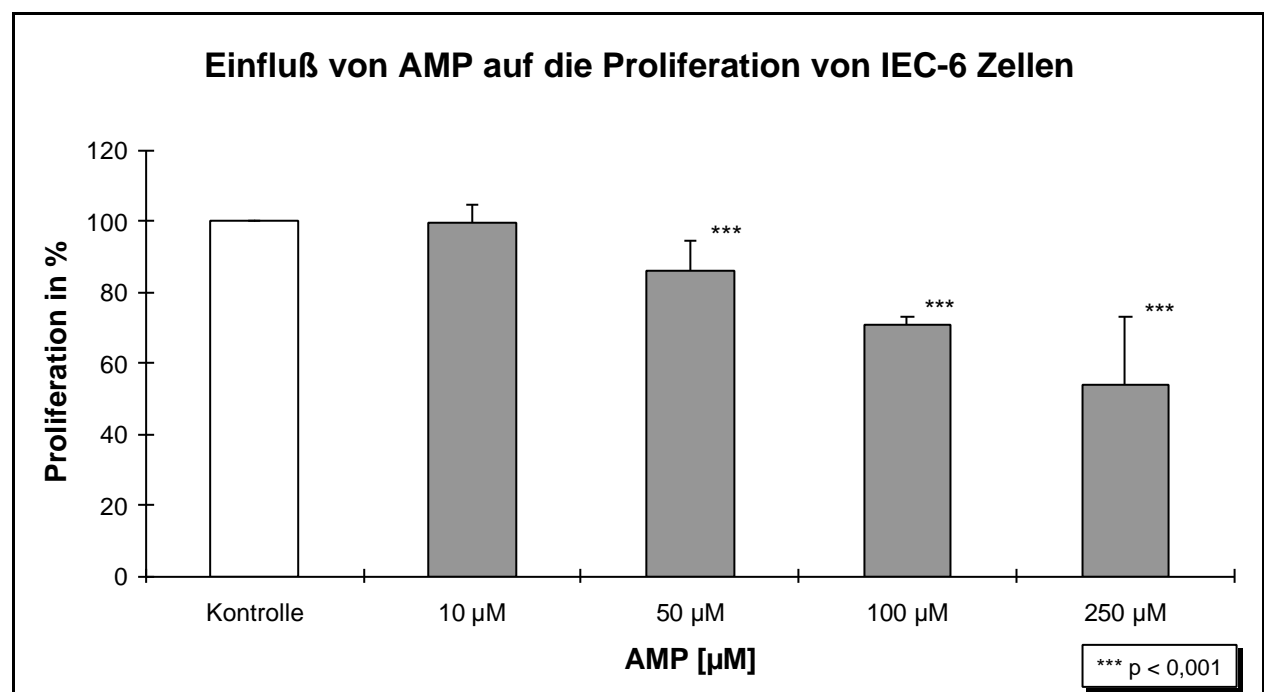


Abbildung 12: Einfluß verschiedener Konzentrationen des Adeninnukleotids AMP auf die Proliferation von IEC-6 Zellen. 4×10^4 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturplatte pipettiert und mit den entsprechenden Konzentrationen AMP versetzt. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch

bestimmt. Den Daten liegen fünfzehnfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Es sind viele Faktoren bekannt, die diesen Prozeß beeinflussen. Wenig weiß man bisher allerdings über die Wirkung von Adeninnukleotiden auf die intestinale epitheliale Proliferation. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß Adeninnukleotide in der Lage sind die Proliferation verschiedener Zellen zu modulieren. So zeigt sich unter anderem bei Nierenepithelzellkulturen von Meerkatzen (BSC-1), daß AMP und ADP in der Lage sind, die DNA-Synthese zu erhöhen (Kartha & Toback, 1985). Bei Mausfibroblasten (3T6) findet man ebenfalls unter Einwirkung von ATP eine DNA-Synthese-Erhöhung (Wang et al., 1990). Im Gegensatz hierzu zeigen Mausfibroblasten der 3T6-Zelllinie nach Gabe von exogenem ATP eine Wachstumsinhibition (Friedberg & Kübler, 1990). Da die Proliferation für die epitheliale Restitution von essentieller Bedeutung ist und die in Kapitel 3.1.1 dargestellten Ergebnisse eine Modulation der Migration von IEC-6 Zellen durch ADP und ATP belegen, ist es interessant zu untersuchen, ob die genannten Substanzen auch zu einer Veränderung der Proliferation von IEC-6 Zellen führen.

Abbildung 12 zeigt die Wirkung von AMP auf die Proliferation von IEC-6 Zellen im *In vitro* Proliferationsassay. Im Gegensatz zur epithelialen Migration, bei der AMP keine Veränderung bewirkte, kam es nach AMP-Applikation zu einer dosisabhängigen Proliferationsinhibition. Schon für Werte von 50 µM war die Inhibition hoch signifikant. Die Proliferation betrug im Vergleich zur Kontrolle nur 86,1% und verringerte sich bei 100 µM AMP auf 70,5% und 250 µM AMP auf 53,8%. Bei Zugabe der Adeninnukleotide ADP und ATP wurde ebenfalls eine Proliferationshemmung der IEC-6 Zellen im MTT-Assay beobachtet (**Abbildung 13** und **14**).

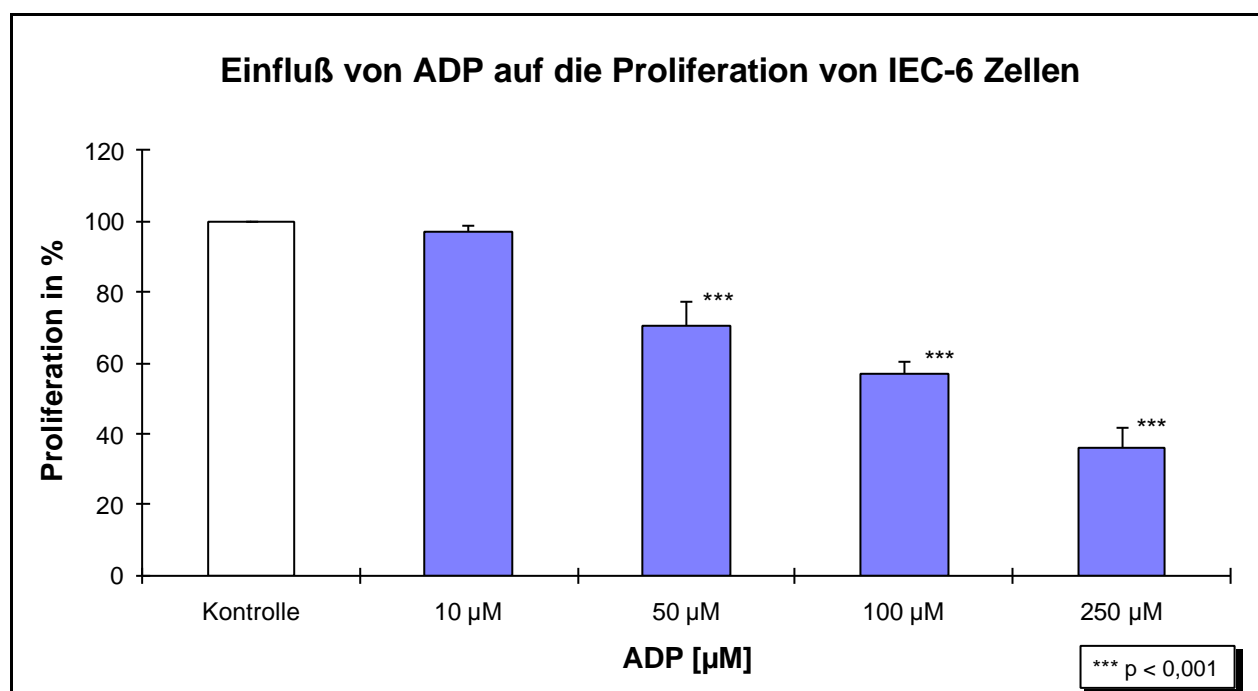


Abbildung 13: Einfluß verschiedener Konzentrationen des Adeninnukleotids ADP auf die Proliferation von IEC-6 Zellen. 5×10^4 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturplatte pipettiert und mit den entsprechenden Konzentrationen ADP versetzt. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch

bestimmt. Den Daten liegen fünfzehnfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Diese war wie zuvor für AMP beschrieben, dosisabhängig, führte aber bei allen Konzentrationen im Vergleich zu AMP zu einer stärkeren Inhibition. 10 μM ADP oder ATP bewirkten keine Verminderung der Proliferationsrate, dagegen war der beobachtete Rückgang der Zellvermehrungsrate ab einer Konzentration von 50 μM hoch signifikant. 250 μM ADP und ATP erwiesen sich als maximal hemmend (250 μM ADP: 36,2%; 250 μM ATP: 35,6%).

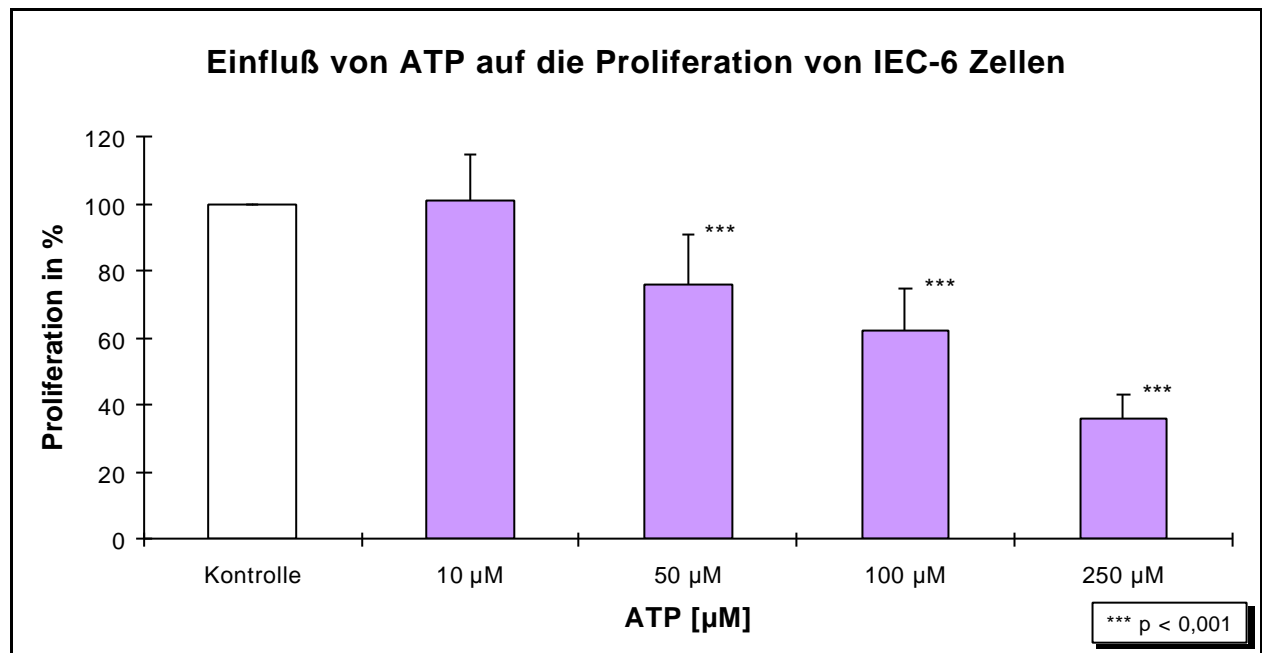


Abbildung 14: Einfluß verschiedener Konzentrationen des Adeninnukleotids ATP auf die Proliferation von IEC-6 Zellen. 5×10^4 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturplatte pipettiert und mit den entsprechenden Konzentrationen ATP versetzt. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt. Den Daten liegen siebzehnfach Bestimmungen von vier unabhängigen Versuchen zugrunde.

Da wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, AMP seine Effekte normalerweise über andere Rezeptoren vermittelt, nämlich Purinrezeptoren der P1-Klassen, als ADP und ATP, die ihre Wirkung an P2-Rezeptoren entfalten, kann nach den vorliegenden Daten davon ausgegangen werden, daß zwei unterschiedliche Mechanismen für die Proliferationshemmung verantwortlich sind. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang jedoch auch, daß ADP und ATP zu AMP abgebaut werden und letztendlich lediglich das Degradationsprodukt dieser beiden Adeninnukleotide für die beobachtete Proliferationshemmung verantwortlich ist. Diese Annahme konnte allerdings durch die in Kapitel 3.1.5 dargelegten Ergebnisse widerlegt werden.

3.1.4 Untersuchungen zur Abhängigkeit der ADP/ATP-vermittelten Proliferationshemmung von TGF β

Die Adeninnukleotide ADP und ATP stimulieren die Migration der intestinalen Epithelzelllinie IEC-6 in einem *In vitro* Wundheilungsmodell und inhibieren gleichzeitig die intestinale Zellproliferation. Damit verhalten sie sich ebenso wie der Wachstumsfaktor TGF β , der einen potenten Stimulator der intestinalen epithelialen Migration (Ciacci et al., 1993) und Inhibitor der epithelialen Proliferation darstellt (Kurokawa et al., 1987). Die Expression von TGF β wurde für *Lamina propria* und Epithelzellen nachgewiesen (Barnard et al., 1993; Babyatsky et al., 1996).

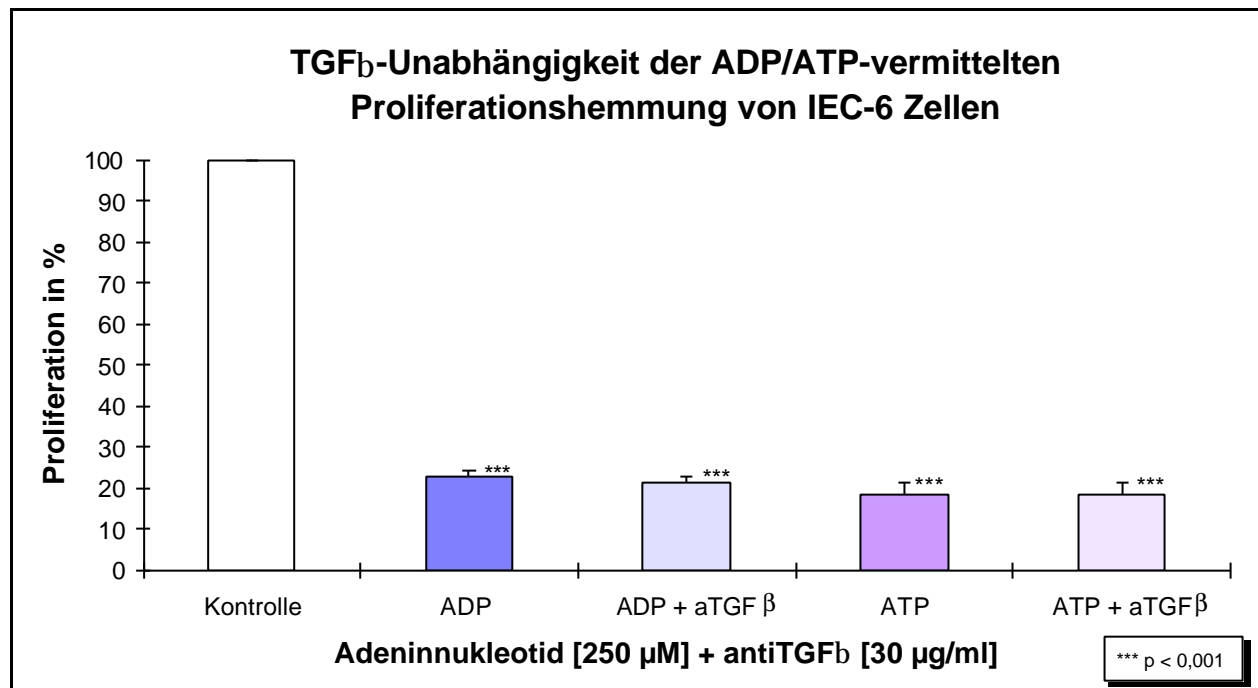


Abbildung 15: Untersuchung zur TGF β -Abhängigkeit der ADP- und ATP-vermittelten Proliferationshemmung bei IEC-6 Zellen. 5×10^4 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturplatte pipettiert und mit 250 μ M ADP oder ATP alleine, oder aber zusätzlich 30 μ g/ml anti-TGF β inkubiert. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt. Den Daten liegen mindestens fünffach Bestimmungen von vier unabhängigen Versuchen zugrunde.

Viele Zytokine regulieren ihre Effekte auf intestinale Epithelzellen über TGF β (Dignass & Podolsky, 1993; Dignass et al., 1994a). Zudem konnte auch für Adeninnukleotide gezeigt werden, daß sie ihre Effekte über Zytokine vermitteln. So fördern Adeninnukleotide die Synthese und Freisetzung von Nerve growth factor (NGF), Neurotrophin-3 (NT3) und Fibroblast Growth Factor (FGF) in Primärkulturen von Rattenastrozyten (Neary et al., 1996). Obwohl, wie in Kapitel 3.1.2 demonstriert, die ADP- und ATP-vermittelte Migrationsstimulation bei IEC-6 Zellen über einen TGF β -unabhängigen Mechanismus vermittelt wurde, wäre es denkbar, daß die Adeninnukleotide ihre proliferationshemmende Wirkung über einen TGF β -abhängigen Wirkmechanismus entfalten. **Abbildung 15** zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der TGF β -Abhängigkeit der ADP und ATP-vermittelten Proliferationshemmung bei IEC-6 Zellen. Die gleichzeitige Zugabe blockierender TGF β -Antikörper führte nicht zu einer Verhinderung der Proliferationshemmung durch ADP und ATP. Die Untersuchung wurde mit maximal wirksamen Adeninnukleotid-Konzentrationen (250 μ M) durchgeführt. Der Antikörper wurde in einer Menge von 30 μ g/ml zugesetzt, einer Konzentration, die sich in vorangegangenen Experimenten als

wirksam bei der Inhibition TGF β -vermittelter Proliferationseffekte erwiesen hatte. Die durchgeführten Experimente belegen damit sowohl für die ADP- und ATP vermittelte Migrationsförderung als auch für die Proliferationsinhibition TGF β -unabhängige Mechanismen.

3.1.5 Charakterisierung des für die Adeninnukleotid-vermittelte Proliferationshemmung verantwortlichen Purinrezeptorsubtyps

Mit Hilfe der folgenden Versuche sollte ermittelt werden, ob an der ADP- und ATP-vermittelten Proliferationshemmung Purinrezeptoren beteiligt sein könnten. Es ist allgemein akzeptiert, daß biologische Antworten auf extrazelluläre Adeninnukleotide in fast jedem Organ und Gewebe beobachtet werden können (Williams, 1987; Dubyak, 1991; O'Connor et al., 1991; Barnard et al., 1994). Zudem sind in zahlreichen Geweben und auf vielen Zellen Purinrezeptoren nachgewiesen (Abbracchio & Burnstock, 1994; Burnstock, 1996). So sind auch im Dünndarm und Dickdarm Rezeptoren für ATP mit Hilfe von Northern Analysen detektiert worden (Soto et al., 1996). Für die transformierten Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 (Inoue et al., 1997) und HT29 (Höpfner et al., 1998) konnte die Anwesenheit von Purinrezeptoren ebenfalls bestätigt werden. In Anbetracht dieser Forschungsergebnisse wäre es durchaus denkbar, daß auch IEC-6 Zellen über Purinrezeptoren verfügen und diese in die ADP- und ATP-vermittelte Proliferationshemmung involviert sind. Da es verschiedene P2-Rezeptoren für ADP und ATP gibt, ist es daher zunächst notwendig zu klären, ob es sich bei der Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen durch ADP und ATP um additive Effekte handelt oder nicht. Sollten verschiedene Rezeptoren die inhibierende Wirkung von ADP und ATP vermitteln, würde es wahrscheinlich zu einer Summierung der Effekte kommen. Das Vorkommen verschiedener Rezeptoren auf einem Zelltyp ist nicht ungewöhnlich, und auch die Vermittlung gleicher Effekte durch verschiedene Adeninnukleotide mittels unterschiedlicher Rezeptoren konnte dokumentiert werden.

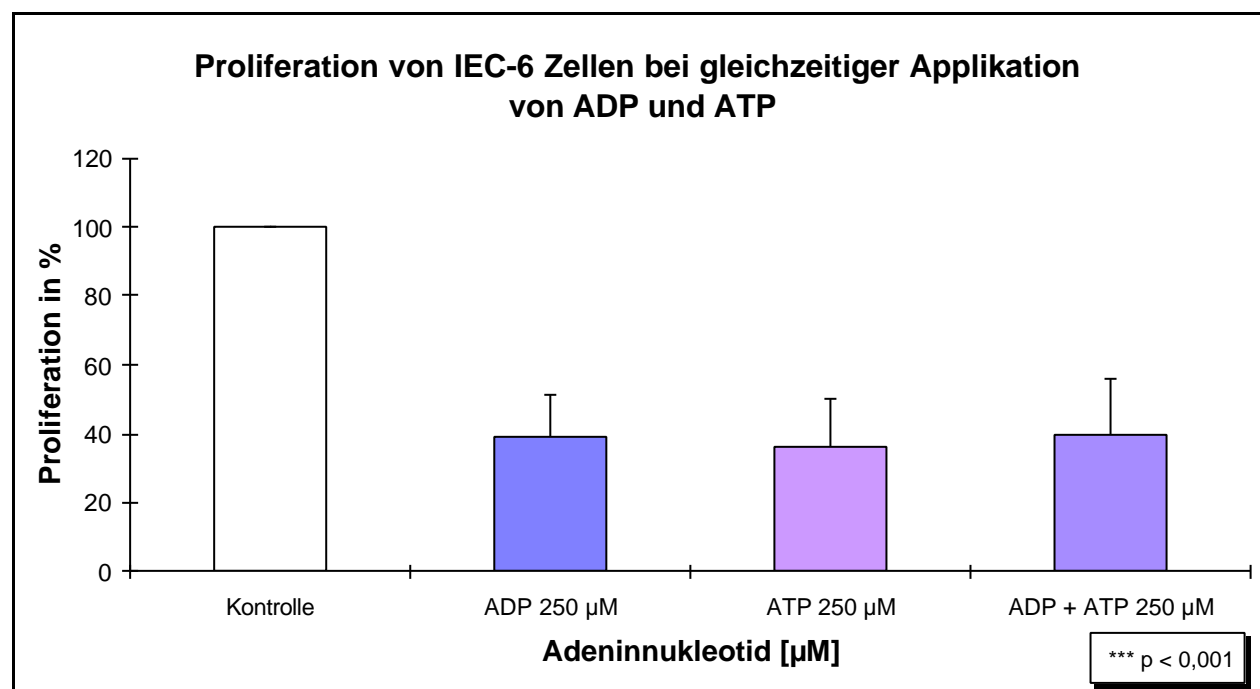


Abbildung 16: Einfluß der Adeninnukleotide ADP und ATP bei einer Konzentration von je 250 µM und gleichzeitiger Applikation auf die Proliferation von IEC-6 Zellen. $2,5 \times 10^4$ Zellen wurden in jede

Vertiefung einer 24-well Gewebekulturplatte pipettiert und mit ADP und ATP versetzt. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt. Den Daten liegen zwei- bis sechsfach Bestimmungen von vier unabhängigen Versuchen zugrunde.

So führt die Applikation von ADP und ATP bei cerebralen Arterien aus Ratten in beiden Fällen zu einer Dilatation. Dennoch konnte nachgewiesen werden, daß beide Adeninnukleotide einen anderen Rezeptorsubtyp zur Vermittlung dieses Effektes aktivieren (You et al., 1997).

Abbildung 16 verdeutlicht, daß die gleichzeitige Applikation von 250 µM ADP und ATP nicht zu einer Erhöhung der Proliferationshemmung führen; vielmehr sind die Werte nahezu identisch im Vergleich zu der einzelnen Verabreichung (250 µM ADP: 39,0%; 250 µM ATP: 36,4%; 250 µM ADP und ATP: 39,9% Proliferation im Vergleich zu den Kontrollen). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß ADP und ATP den gleichen Rezeptor aktivieren. Wie schon in Kapitel 3.1.3 erläutert, wäre es möglich, daß die beobachteten Effekte auf Abbauprodukte von ADP und ATP zurückzuführen sind, vor allem in Anbetracht der Tatsache, daß auch AMP eine proliferationshemmende Wirkung auf IEC-6 Zellen besitzt. Um diese Möglichkeit auszuschließen, kann man sich schwer hydrolysierbarer ATP-Analoga bedienen. Diese Substanzen haben während der Erforschung von Purinrezeptoren erhebliche Bedeutung besessen. So war man lange Zeit - und ist es zum Teil auch heute noch - angewiesen auf Agonistenstammreihen um eine Charakterisierung von Purinrezeptorsubtypen vorzunehmen.

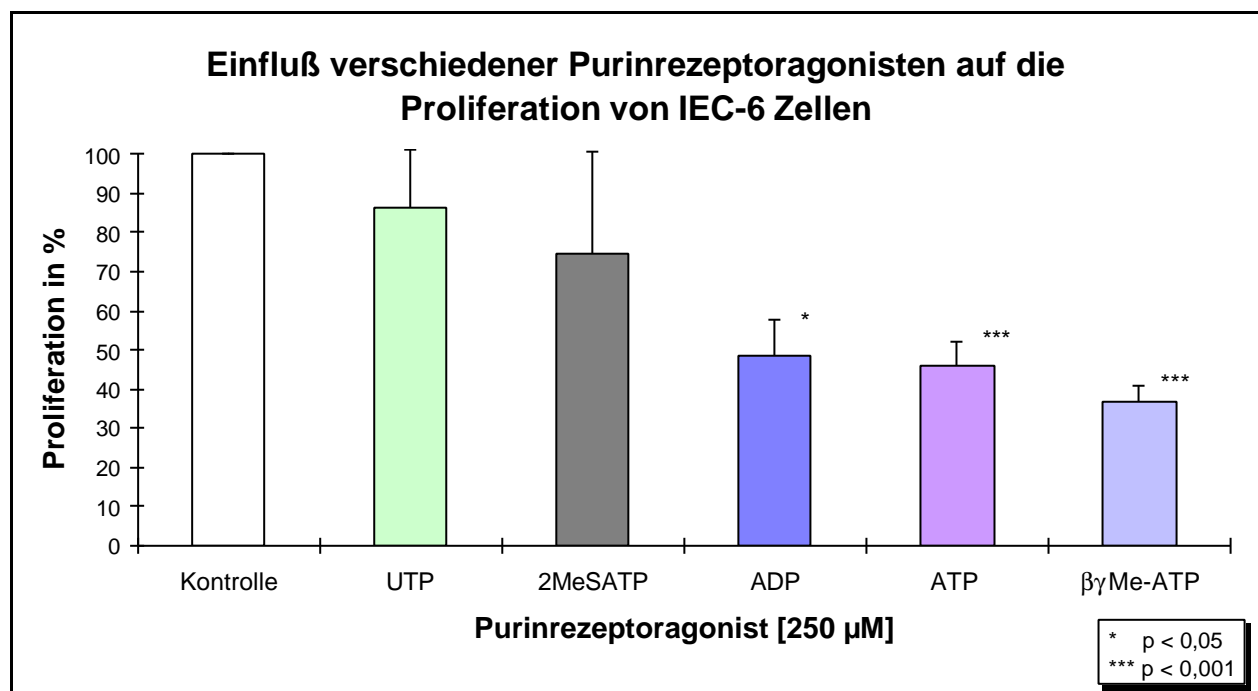


Abbildung 17: Vergleich der Wirkung von ADP und ATP, sowie verschiedener Purinrezeptoragonisten in einer Konzentration von 250 µM auf die Proliferation von IEC-6 Zellen. 4×10^4 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturplatte pipettiert und mit den angegebenen Adeninnukleotide oder P2-Rezeptoragonisten inkubiert. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt. Den Daten liegen drei- bis sechsfach Bestimmungen von vier unabhängigen Versuchen zugrunde.

Nachdem Burnstock 1978 die Unterscheidung in P1-Rezeptoren und P2-Rezeptoren vorgenommen hatte, wurden in den darauffolgenden Jahren unzählige Wirkungen von Adeninnukleotiden auf unterschiedliche Gewebe und Zelltypen beschrieben. Um diese zu charakterisieren, bediente man sich verschiedenster ATP-Analoga und stellte Agonistenstammreihen auf, in denen diese nach ihrer Wirksamkeit eingereiht wurden (Burnstock & Kennedy, 1985). Im Jahr 1994 unterschied man 6 verschiedene Subfamilien bei den P2-Rezeptoren: P2x, P2y, P2u, P2t, P2z und P2d (Fredholm et al., 1994). Anhand der zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Daten sollte eine Klassifizierung des Rezeptors vorgenommen werden, der die Proliferationshemmung bei IEC-6 Zellen durch ADP und ATP vermittelt. Eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Subtyp nach der von Fredholm et al. (1994) vorgeschlagenen Klassifizierung kann mit Hilfe der ATP-Analoga UTP, 2MeSATP und $\beta\gamma$ Me-ATP im Vergleich zu den Daten von ADP und ATP vorgenommen werden.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung zur Proliferationshemmung unter Verwendung der ATP-Analoga. Die Wirkungen der einzelnen Substanzen waren gut voneinander abgestuft. Alle Substanzen wurden in der gleichen Konzentration von 250 μ M eingesetzt. Besonders deutlich ist zu erkennen, daß $\beta\gamma$ Me-ATP die stärkste proliferationshemmende Wirkung entfaltete (36,9%), UTP dagegen keine Proliferationshemmung bewirkte. 2MeSATP verringerte die Proliferation von IEC-6 Zellen auf einen Wert von 74,6% im Vergleich zur Kontrolle und war damit weniger wirksam als ADP und ATP. Für die Proliferationshemmung bei intestinalen Epithelzellen ergibt sich nach den vorliegenden Daten eine Agonistenstammreihe von:

$$\beta\gamma\text{Me-ATP} > \text{ATP} \geq \text{ADP} > 2\text{MeATP} > \text{UTP}$$

Die Wirkung von ADP und ATP bei Annahme des gleichen Rezeptors schließt den P2d-Rezeptor aus, da ATP dort antagonistisch wirkt. Die Tatsache, daß UTP keine Proliferationshemmung bei IEC-6 Zellen bewirkt, bedeutet, daß nach der Definition von Fredholm et al. (1994) der P2u-Rezeptorsubtyp ausscheidet. Am P2z-Rezeptor wirkt ausschließlich das ATP^{4-} -Ion und der P2t-Rezeptor wurde bisher nur auf Thrombozyten beschrieben. Da die wirksamste Substanz für den P2y-Rezeptorsubtyp MeSATP ist, scheidet auch dieser nach den angewandten Kriterien aus. Die Agonistenstammreihe stimmt am besten mit den Beschreibungen für den P2x-Rezeptorsubtyp überein.

Zur gleichen Zeit, als man sich bei der Rezeptorklassifizierung noch der Agonistenwirkreihen bediente, begann die Umsetzung der erfolgreichen Bestrebungen die Rezeptoren, auch in molekularbiologischer Hinsicht zu charakterisieren. Diese Entwicklung hat sich bis zum heutigen Tag intensiviert. Die ersten klonierten Purinrezeptoren waren der P2y1-Rezeptor aus dem Hühnerhirn (Webb et al., 1993) und der P2u-Rezeptor aus Neuroblastomazellen (Lustig et al., 1993). Die neuen Erkenntnisse ermöglichten genauere Beschreibungen und machten eine Neuordnung der Subfamilien notwendig. So unterscheidet man aufgrund der Sequenzanalysen heute lediglich 2 Familien: P2y und P2x (Burnstock 1996). P2u-, P2d- und P2t-Rezeptoren werden der P2y-Familie zugerechnet, während der P2z-Rezeptor Ähnlichkeiten mit den P2x-Subtypen aufweist.

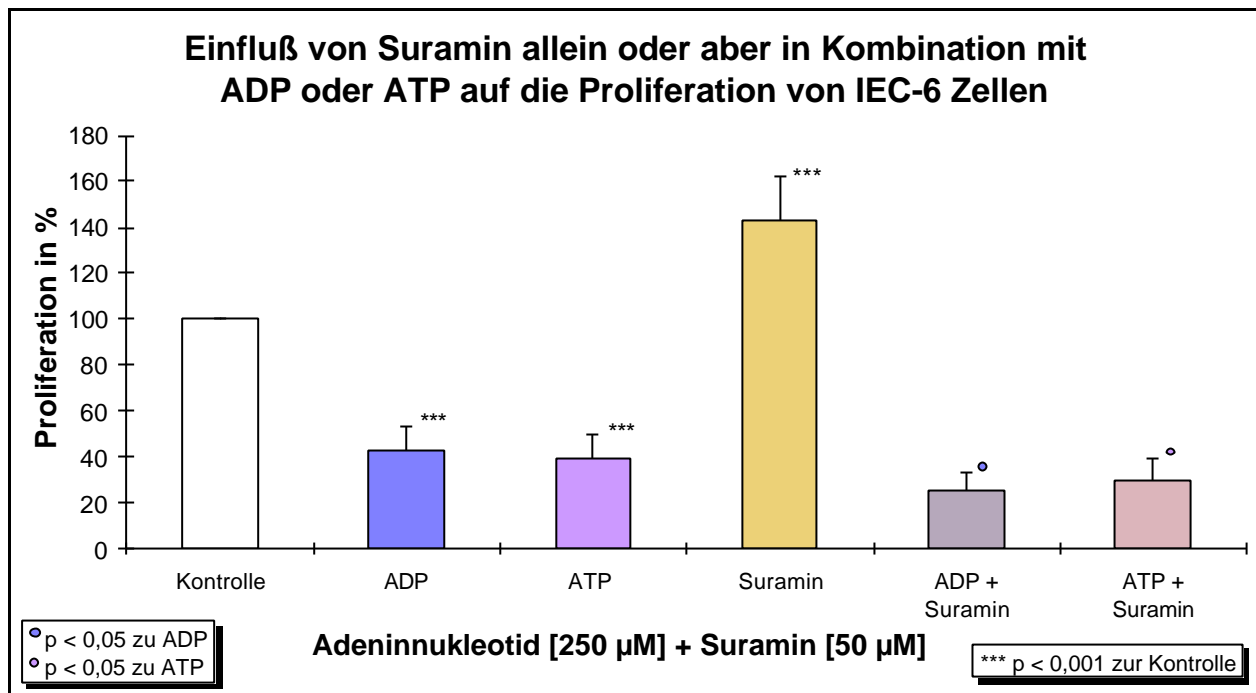


Abbildung 18: Untersuchung der Proliferationsmodulation von IEC-6 Zellen durch Suramin oder aber ADP und ATP in Kombination mit Suramin. 250 µM ADP oder ATP oder 50 µM Suramin wurden alleine zu 3×10^4 IEC-6 Zellen gegeben. Parallel wurden 50 µM Suramin gemeinsam mit 250 µM ADP oder ATP appliziert. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt. Den Daten liegen vier- bis achtfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Auch nach der neuen Klassifizierung von Burnstock (1996) trifft die oben vorgenommene Klassifizierung des Rezeptorsubtyps für die Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen zu, dennoch gibt es eine Vielzahl von Aspekten, die eine definitive Einordnung schwierig gestalten. Diese sollen in der Diskussion der Ergebnisse ausführlich dargelegt werden.

Eine Substanz, welche man zur Charakterisierung von Purinrezeptoren eingesetzt hat, ist Suramin. Es handelt sich bei Suramin um ein Medikament mit anti-trypanosoider Wirkung, welches als Antagonist an P2-Rezeptoren beschrieben ist (Dunn & Blakeley, 1988). Untersuchungen mit Suramin ermöglichen allerdings keine Unterscheidung zwischen P2x- und P2y-Rezeptorsubtypen (Hoyle et al., 1990). Suramin wirkte auf IEC-6 Zellen (**Abbildung 18**) hoch signifikant proliferationsfördernd (143,6% im Vergleich zur Kontrolle). Damit zeigte sich, daß Suramin einen gegensätzlichen Effekt im Vergleich zu ADP und ATP ausübt. Bei gleichzeitiger Applikation von Suramin und ADP oder ATP wurde die proliferationshemmende Wirkung der Adeninnukleotide durch Suramin nicht aufgehoben. Dies könnte daran liegen, daß der angesprochene P2-Rezeptorsubtyp insensitiv gegenüber Suramin ist. Eine Insensitivität gegenüber Suramin ist mittlerweile für eine Reihe von P2-Rezeptoren dokumentiert (Soto et al., 1996). Dies trifft vor allem für P2x-Rezeptorsubtypen zu. Nach den vorliegenden Ergebnissen wäre die proliferationsfördernde Wirkung von Suramin unabhängig von einer antagonistischen Wirkung am P2-Rezeptor, was aufgrund der vielfältigen Wirkungen von Suramin auf verschiedene Signalwege denkbar ist.

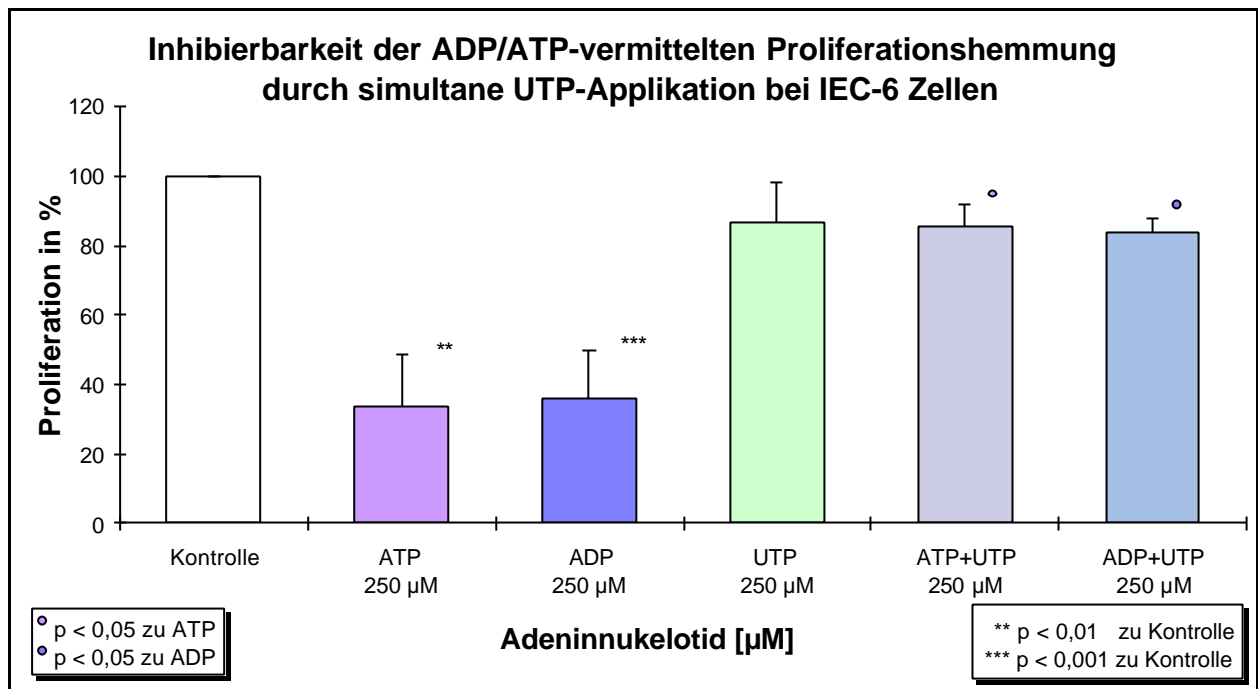


Abbildung 19: Untersuchung zur aufhebenden Wirkung der ADP- und ATP-bedingten Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen bei gleichzeitiger Applikation von 250 µM UTP. 250 µM ADP oder ATP wurden alleine oder aber in Kombination mit 250 µM UTP zu 4×10^4 IEC-6 Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden außerdem 250 µM UTP alleine appliziert. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt. Den Daten liegen zwei- bis sechsfach Bestimmungen von vier unabhängigen Versuchen zugrunde.

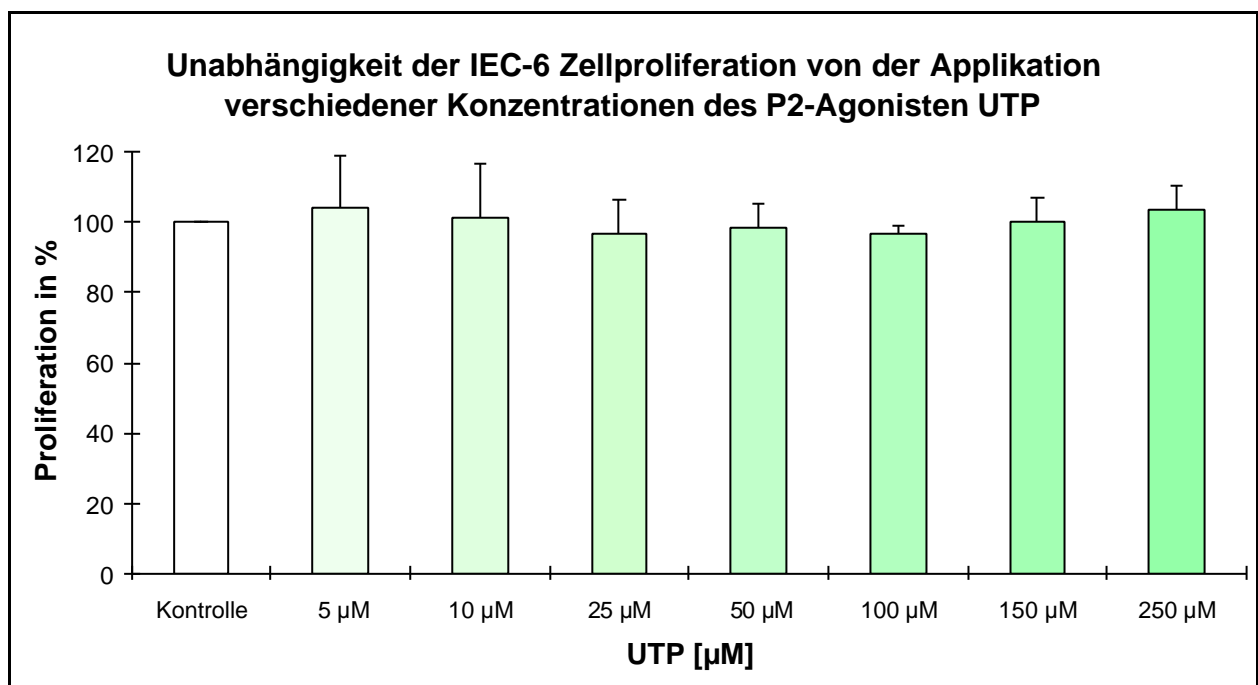


Abbildung 20: Einfluß verschiedener Konzentrationen von UTP auf die Proliferation von IEC-6 Zellen. 3×10^4 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturplatte pipettiert und mit den entsprechenden Konzentrationen UTP versetzt. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt.

Den Daten liegen vier- bis sechsfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Ein interessanter und neuer Aspekt des Rezeptors auf intestinalen Epithelzellen konnte mit Hilfe von Proliferationsversuchen beschrieben werden, in denen UTP und ADP oder ATP gleichzeitig appliziert wurden. In Vorversuchen wurden zunächst stark proliferations-inhibierende Konzentrationen von ADP und ATP bei gleichzeitiger Gabe von 250 μM UTP eingesetzt. **Abbildung 19** zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung. 250 μM UTP waren in der Lage die proliferationsinhibierende Wirkung von 250 μM ADP und ATP bis auf das Niveau der Wirkung von UTP aufzuheben. Um zu klären, ob die Wirkung von UTP konzentrations-abhängig war, wurden die Untersuchungen mit ansteigenden UTP-Konzentrationen bei gleichbleibend hoher Applikation von ADP und ATP (250 μM) wiederholt. Da bis zu diesem Zeitpunkt lediglich die Wirkung hoher UTP-Konzentrationen auf die epitheliale Proliferation von IEC-6 Zellen untersucht worden war und ausgeschlossen werden mußte, daß niedrige UTP-Konzentrationen gegenteilige Effekte auf IEC-6 Zellen ausüben, wurden, wie in **Abbildung 20** gezeigt, UTP-Konzentrationen zwischen 5 und 250 μM auf ihre Wirkung auf die epitheliale Zellproliferation untersucht. Es zeigten sich keinerlei relevante Effekte durch UTP.

In den **Abbildungen 21** und **22** sind die Ergebnisse zur Aufhebbarkeit der proliferations-hemmenden Wirkung von ADP und ATP durch ansteigende UTP-Konzentrationen gezeigt. Sowohl für ADP als auch für ATP gilt, daß ihre Wirkung auf die Proliferation von IEC-6 Zellen mit steigenden UTP-Konzentrationen abnimmt.

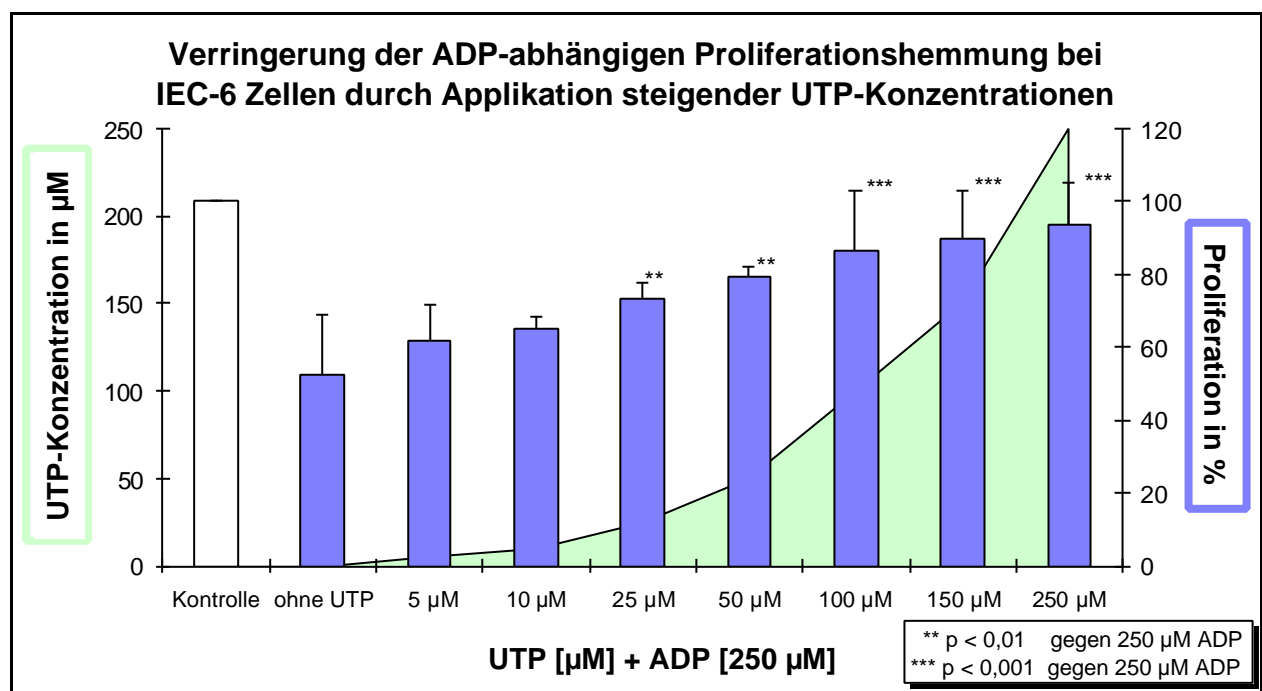


Abbildung 21: Untersuchung zur aufhebenden Wirkung der ADP-bedingten Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen bei gleichzeitiger Applikation von UTP. 250 μM ADP alleine oder aber in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen von UTP wurde zu 4×10^4 IEC-6 Zellen gegeben. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt. Den Daten liegen drei- bis sechsfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

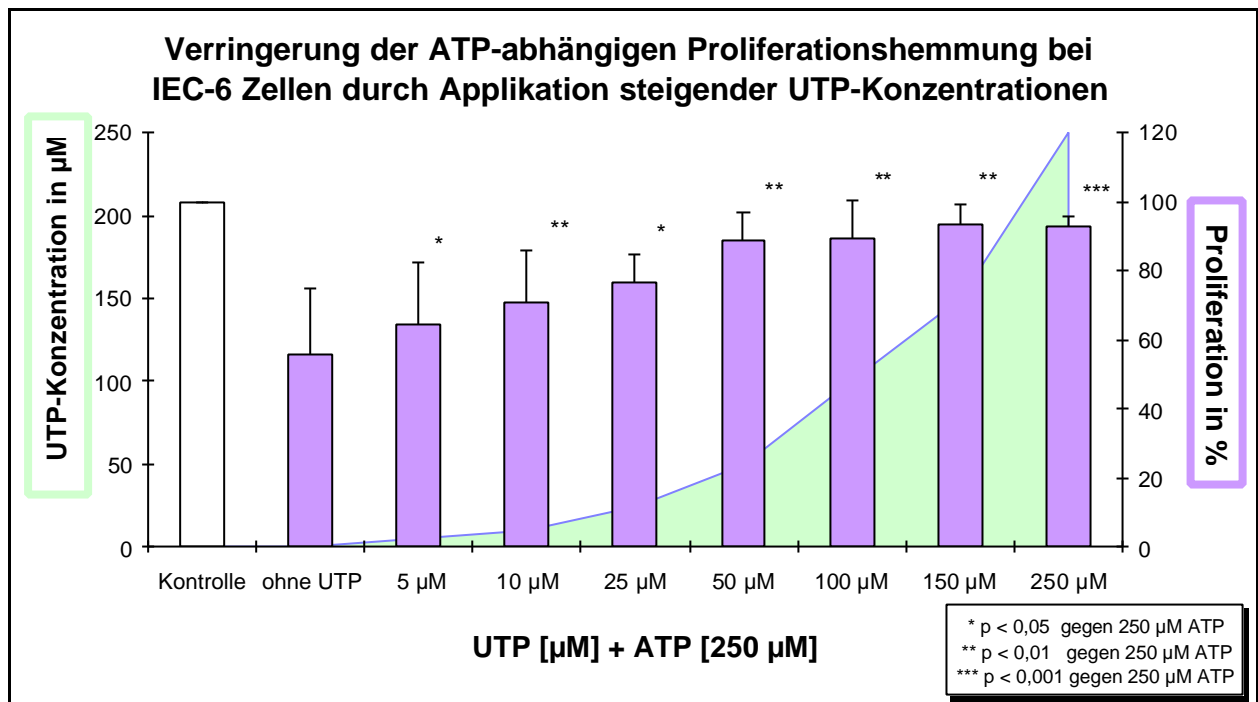


Abbildung 22: Untersuchung zur aufhebenden Wirkung der ATP-bedingten Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen bei gleichzeitiger Applikation von UTP. 250 µM ATP alleine oder aber in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen von UTP wurde zu 4×10^4 IEC-6 Zellen gegeben. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt. Den Daten liegen drei- bis sechsfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

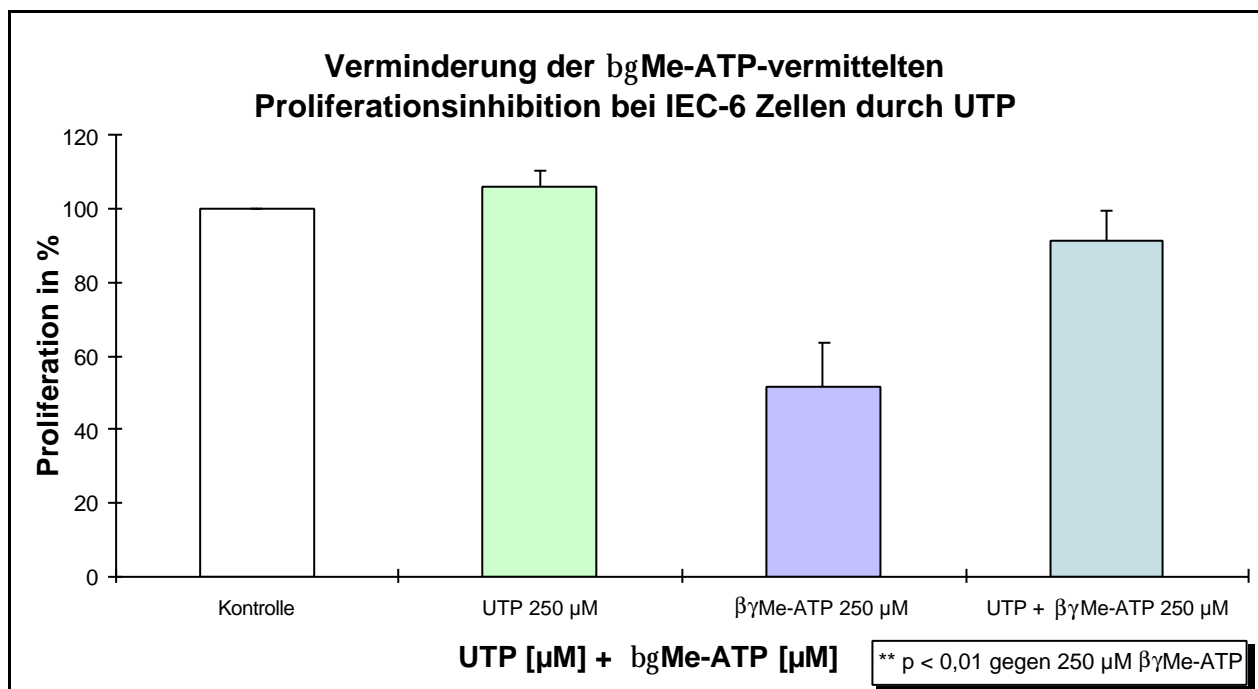


Abbildung 23: Untersuchung zur aufhebenden Wirkung der γ Me-ATP-bedingten Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen bei gleichzeitiger Applikation von 250 µM UTP. 250 µM γ Me-ATP wurden alleine oder aber in Kombination mit 250 µM UTP zu 4×10^4 IEC-6 Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden außerdem 250 µM UTP alleine appliziert. Die Proliferation wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationsassays, wie in Material und Methoden beschrieben, spektrophotometrisch bestimmt.

Den Daten liegen drei bis sechsfach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Ab einer Konzentration von 25 μM UTP für die ADP-vermittelte und schon ab 5 μM für ATP-vermittelte Proliferationsinhibition kommt es zu einer signifikanten Veränderung des Hemmeffektes. Die starke Dosisabhängigkeit spricht für die gleichzeitige Besetzung eines Rezeptors, nicht aber für gegensätzliche Effekte in Form von Proliferationsinhibition und -stimulation. UTP wirkt also als kompetitiver Antagonist an dem P2-Rezeptor, der von ADP und ATP zur Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen aktiviert wird. Inwieweit diese Ergebnisse auch für den P2x-Rezeptoragonisten $\beta\gamma\text{MeATP}$ zutreffen, wurde in einem ergänzenden Versuch ermittelt.

In **Abbildung 23** ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Auch die durch $\beta\gamma\text{MeATP}$ -vermittelte Proliferationshemmung bei IEC-6 Zellen konnte durch gleichzeitige Applikation von UTP unterbunden werden. Damit bestätigte sich die Annahme, daß die von ADP, ATP und $\beta\gamma\text{MeATP}$ -vermittelte Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen durch die Aktivierung des gleichen Rezeptors bewirkt wurde.

3.1.6 Untersuchung zur Wirkung des Purinrezeptoragonisten $\beta\gamma\text{Methylen ATP}$ auf die Migration von IEC-6 Zellen

In den Untersuchungen zur Modulation der Proliferation von intestinalen Epithelzellen hatte sich der P2x-Rezeptor-Agonist $\beta\gamma\text{Me-ATP}$ im Vergleich zu allen anderen Adeninnukleotiden oder Agonisten als wirksamster Inhibitor herausgestellt.

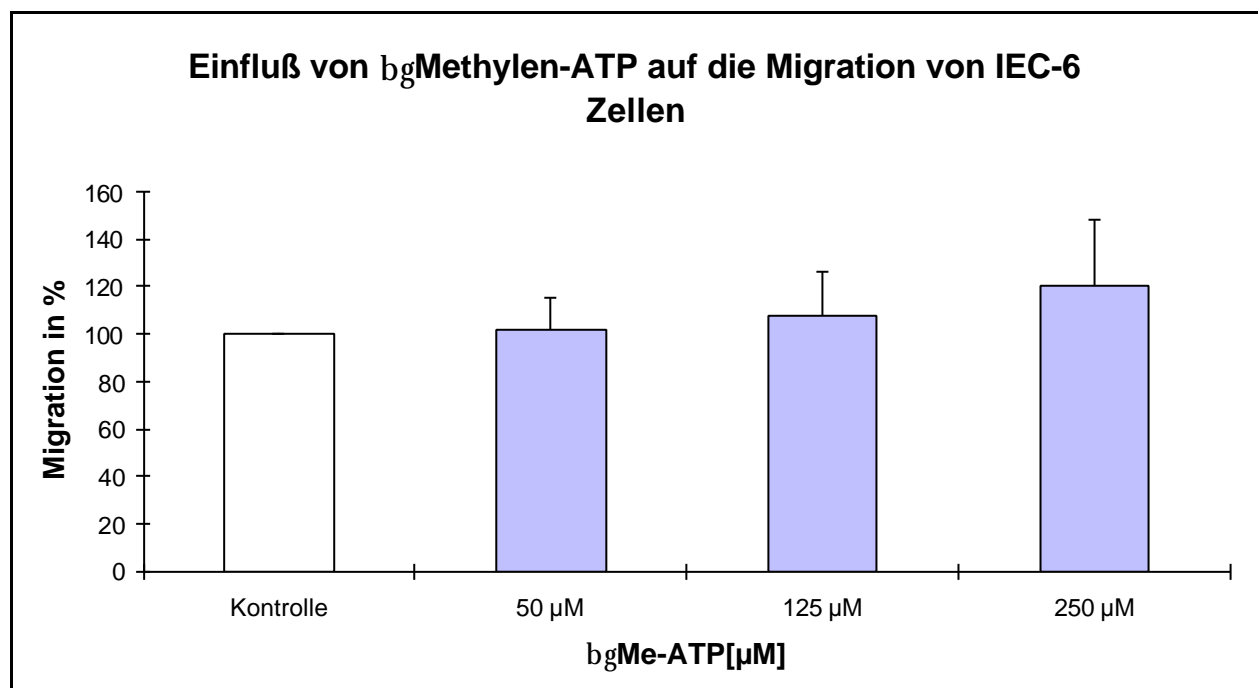


Abbildung 24: Wirkung verschiedener Konzentrationen des Purinrezeptoragonisten $\beta\gamma\text{Methylen ATP}$ ($\beta\gamma\text{Me-ATP}$) auf die Migration von IEC-6 Zellen. In konfluenten IEC-6 Monolayern wurden mit sterilen Rasierklingen zwei bis drei Wunden erzeugt. Die Migration wurde an markierten Stellen 24 h

später fotografisch quantifiziert. Den Daten liegen sechs- (50 μ M) bis zehnfach-Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Um zu überprüfen, ob die ADP- und ATP-vermittelte Migrationsstimulation mit Hilfe des gleichen Mechanismus und Rezeptors bewerkstelligt wird, mit der die Proliferationsinhibition von IEC-6 Zellen vermittelt wird, wurde $\beta\gamma$ Me-ATP auf seine Fähigkeit hin untersucht, die Migration von intestinalen Epithelzellen zu modulieren. **Abbildung 24** zeigt, daß verschiedene Konzentrationen des P2x-Rezeptoragonisten $\beta\gamma$ Me-ATP nicht in der Lage waren die Migration von intestinalen Epithelzellen in dem *In vitro* Wundheilungsmodell zu modulieren. Daher muß davon ausgegangen werden, daß die beobachtete ADP- und ATP-vermittelte Migrationsstimulation und Proliferationsinhibition bei IEC-6 Zellen mit Hilfe unterschiedlicher Mechanismen bewerkstelligt wird.

3.1.7 Bestimmung der MAP-Kinase Aktivität von IEC-6 Zellen nach Applikation von ADP, ATP und $\beta\gamma$ Me-ATP

Bei zusammenfassender Betrachtung konnten die bisher durchgeführten Experimente zeigen, daß die epitheliale Migration von IEC-6 Zellen durch die Adeninnukleotide ADP und ATP stimuliert wurde. Gleichzeitig bewirkten ADP, ATP und $\beta\gamma$ Me-ATP eine starke Proliferationsinhibition von IEC-6 Zellen *in vitro*.

Im Zusammenhang mit der Vermittlung mitogener Effekte auf Zellen sind MAP-Kinase-Übertragungswege von essentieller Bedeutung (Ahn et al., 1992; Davis, 1993; Avruch et al., 1994). MAP-Kinase-Wege stellen aber auch attraktive Kandidaten bei der Übertragung von Wundsignalen, dar. So kommt es z.B. bei mechanischer Blattverletzung zu einer Aktivierung der Tabak-MAP-Kinase, die eine extrem große Ähnlichkeit mit der ERK in Säugetieren besitzt (Seo et al., 1995). In konkretem Zusammenhang zu den beschriebenen Versuchsergebnissen stehen die Untersuchungen von Dieckgräfe et al. (1997), die nach mechanischer Verletzung von IEC-6 Monolayern eine Aktivierung der ERK- und des p38-Signalweges beschreiben.

Auch die Wirkung von Adeninnukleotiden und die Aktivierung von Purinrezeptoren wird in engem Zusammenhang mit MAP-Kinase-Signalwegen gesehen. So führt die ATP-vermittelte P2-Rezeptoraktivierung in Astrozyten zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen (Neary, 1996) und die ADP-Applikation bei BSC-1 Zellen zur Induktion früher Gene der Wachstumsregulation (Kartha et al., 1992). Diese Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen lassen auf eine Beteiligung von MAP-Kinase-Signalwegen bei Adeninnukleotid-vermittelten Modulationen der epithelialen Restitution im allgemeinen und Migrationsstimulation- und Proliferationsinhibitionsprozessen im Konkreten schließen. **Abbildung 25** faßt die Ergebnisse von 4 Versuchen zusammen, in denen die MAP-Kinase-Aktivität anhand der Umsetzung von MBP in IEC-6 Zellen nach Applikation von 250 μ M ADP, ATP und $\beta\gamma$ Me-ATP im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen wurde. Alle Versuche zeigten übereinstimmend, daß nach Applikation von ADP, ATP oder auch $\beta\gamma$ Me-ATP eine erhöhte Umsetzung des MBP beobachtet werden konnte. Diese Phosphorylierung von MBP gilt als eine Maß für die Aktivität von MAP-Kinasen, im besonderen von ERK-1 und ERK-2 (Alessi et

al., 1995) und ist auch zur Messung der Kinase-Aktivität von IEC-6 Zellen erfolgreich eingesetzt worden (Göke et al., 1998).

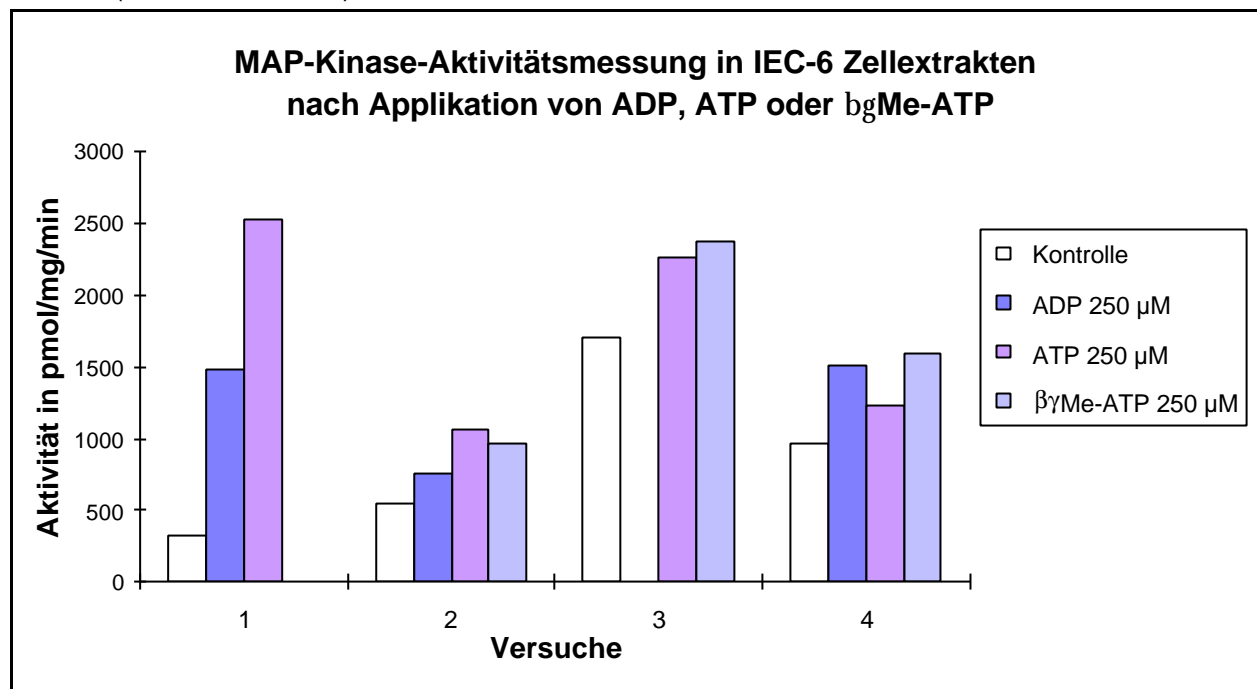


Abbildung 25: Messung der MAP-Kinase-Aktivität von IEC-6 Zellen nach fünfminütiger Applikation von 250 µM ADP, ATP oder β gMethylen-ATP. Die Messung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die Darstellung zeigt die Ergebnisse von vier unabhängig durchgeführten Versuchen.

Das Ausmaß der Aktivierung in den Einzelversuchen ist sehr unterschiedlich, so daß keine Aussage über die Höhe der Aktivitätssteigerung gemacht werden kann. Zudem muß bedacht werden, daß es bei der durchgeführten Untersuchungsmethode in gewissem Maße zu einer Interferenz mit anderen Kinasen kommen kann, da MBP in geringem Maße auch von anderen Serin-spezifischen Kinasen umgesetzt werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse legen aufgrund der vorwiegenden Phosphorylierungen durch ERK-1 und ERK-2 eine Beteiligung von MAP-Kinase-Signalwegen bei der Adeninnukleotid-vermittelten Wirkung auf intestinale Epithelzellen der Zelllinie IEC-6 nahe.

3.1.8 Einfluß von Adeninnukleotiden und Purinrezeptoragonisten auf die Vitalität von IEC-6 Zellen

Die im Anschluß an die Proliferationsuntersuchungen durchgeführten Experimente zur Vitalität der IEC-6 Zellen nach Behandlung mit Adeninnukleotiden sollten ausschließen, daß es sich bei der Proliferationsinhibition um die Beobachtung von Letalität handelt. Zunächst wurden daher alle verbliebenen Zellen auf ihre Vitalität hin mit Hilfe einer Trypanblaufärbung untersucht. Die Gesamtzahl der beobachteten Zellen wurde als 100% definiert. Daher geben die in **Abbildung 26** dargestellten Ergebnisse die zuvor beschriebene Proliferationsinhibition nicht wieder. Die in der Abbildung wiedergegebenen Daten bestätigen, daß es nach der Applikation von 250 µM ADP

oder ATP nicht zu einem Anstieg geschädigter Zellen kommt. Vielmehr bleibt der Anteil vitaler, ungefärbter und letaler, blau gefärbter Zellen sowohl bei der Kontrolle als auch bei den behandelten Zellen mit 3,2-4,2% gleich.

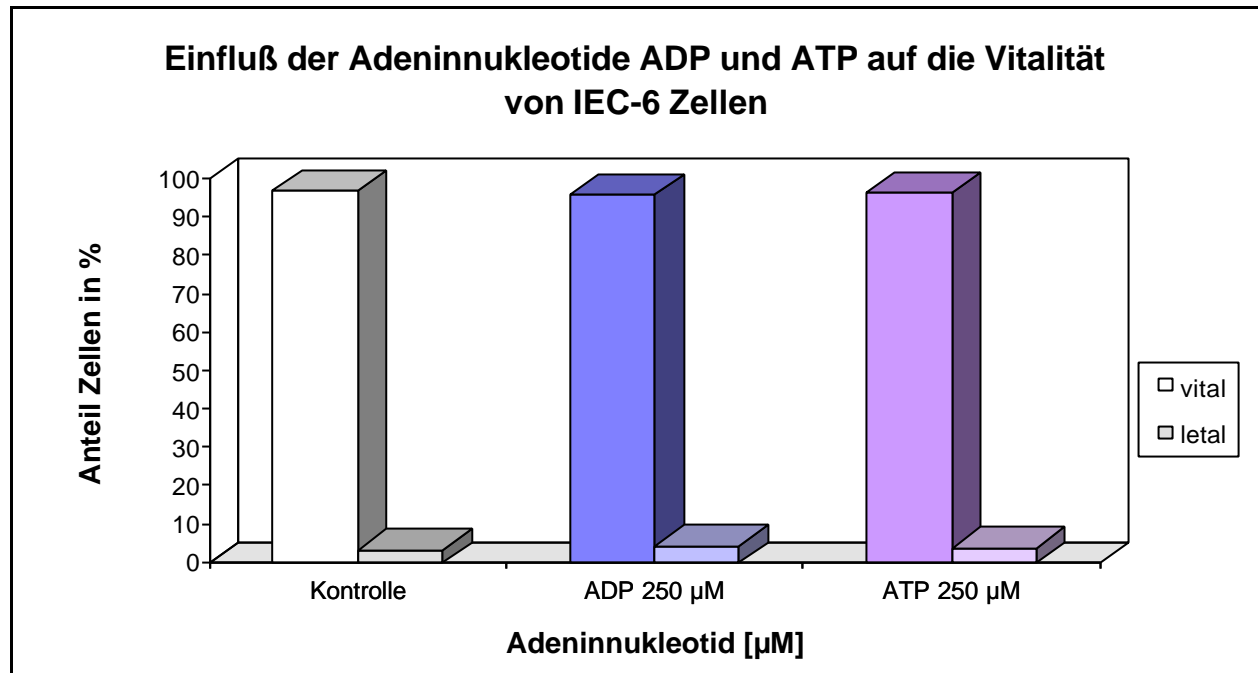


Abbildung 26: Untersuchung zum Einfluß von ADP und ATP auf die Vitalität von IEC-6 Zellen. Die Zellen wurden für die Dauer von 24 Stunden mit 250 µM ADP oder ATP inkubiert. Anschließend wurden sie trypsinisiert und mit Trypanblau (Kapitel 2.2.10) gefärbt. Der Anteil vitaler und letaler Zellen wurde ausgezählt und der Prozentanteil an der Gesamtzahl aller Zellen berechnet. Die Darstellung zeigt die Ergebnisse vierfacher Bestimmungen von vier unabhängigen Versuchen.

Im Zusammenhang mit der Wirkung von Adeninnukleotiden und der Signalübertragung durch Purinrezeptoren werden in letzter Zeit auch apoptotische Vorgänge diskutiert. Dies liegt vor allem darin begründet, daß eine Sequenzhomologie zwischen bestimmten P2x-Rezeptoren und einem Protein, welches ausschließlich in apoptotischen Zellen exprimiert wird, existiert. Dieses Protein trägt den Namen RP-2 und wird in apoptotischen Thymozyten z.B. nach Applikation von Glukokortikoiden gebildet (Valera et al., 1994, Brake et al., 1994). Der Zusammenhang zwischen Applikation von ATP und daraus resultierendem Zelltod konnte in Thymozyten (Zheng et al., 1996), Hepatozyten (Zoetewij et al., 1992) und anderen Zellen (Spranzi et al., 1993) gezeigt werden. Zur Untersuchung der Hypothese, daß es auch in IEC-6 Zellen zu apoptotischen Veränderungen nach Applikation von ADP, ATP oder $\beta\gamma$ Me-ATP kommt, wurden die Zellen zunächst auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Dazu wurden die Zellen 72 Stunden mit 250 µM ADP, ATP oder $\beta\gamma$ Me-ATP inkubiert. Anschließend wurden sie unter dem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung betrachtet. Im Zusammenhang mit Apoptosevorgängen können z.B. die Kondensation des Cytoplasmas, die Segmentation des Nukleus und ein Aufblähen der Membran beobachtet werden. Allerdings konnten bei der morphologischen Untersuchung der IEC-6 Zellen keine dieser Anzeichen ausgemacht werden. Da als ein wichtiger Marker für Apoptose die Degradation von DNA in ungefähr 200 Basenpaar große Fragmente beschrieben ist (Wyllie et al., 1980), wurde die DNA der behandelten IEC-6 Zellen auf dieses Merkmal hin untersucht.

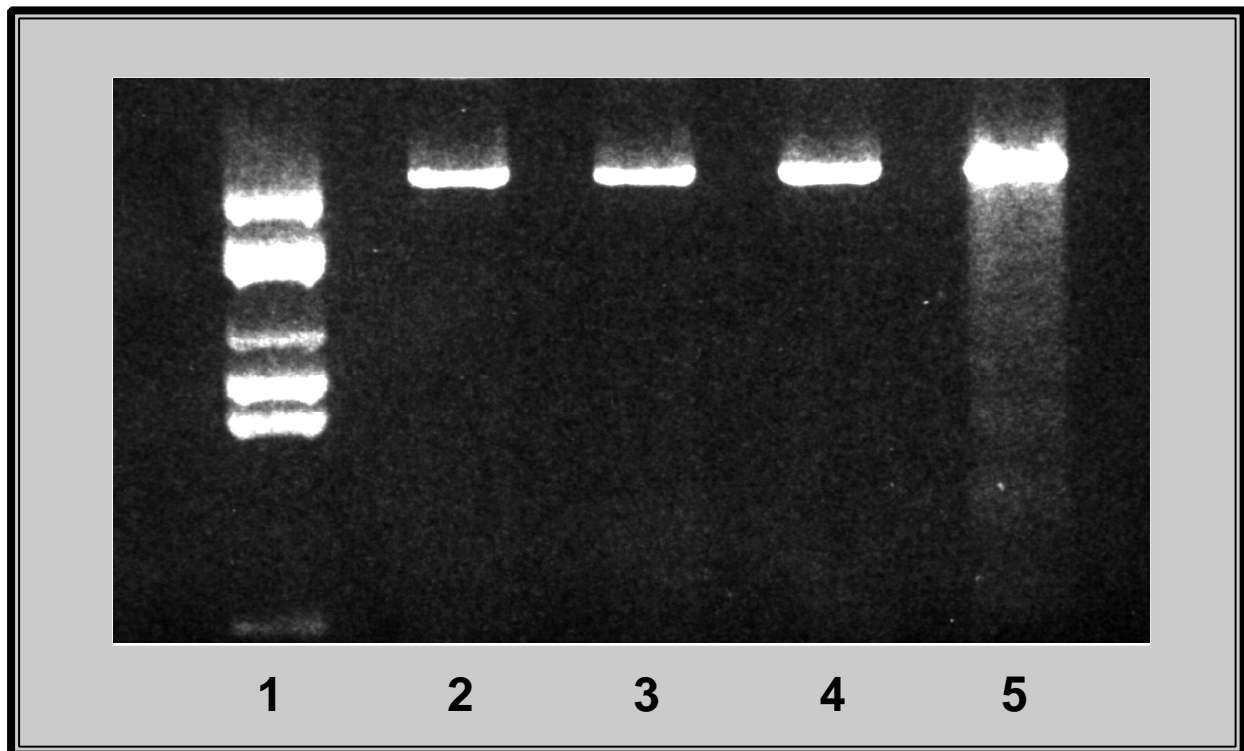


Abbildung 27: Untersuchung der DNA von IEC-6 Zellen auf DNA-Leiterbildung als Anzeichen von Apoptose nach Behandlung mit Adeninnukleotide oder deren Agonisten
IEC-6 Zellen wurden 72 h mit Kulturmedium ohne Zusätze (Kontrolle) , 250 μ M ATP oder 250 μ M β gMe-ATP inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die DNA nach Vorschrift isoliert. 1,5 μ g DNA jeder Probe wurde im 1,2%igem Agarosegel auf DNA-Leiterbildung untersucht. Folgende Auftragung wurde gewählt: 1 - DNA-Marker pBR322DNA, Alw44I/MvaI geschnitten; 2 - Kontrolle; 3 - 250 μ M ATP; 4 - 250 μ M β gMe-ATP; 5 - Positivkontrolle, DNA apoptotischer U937 Zellen.

Abbildung 27 zeigt die Analyse der DNA aus IEC-6 Zellen nach 72stündiger Behandlung mit 250 μ M ATP oder β gMe-ATP im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Es sind keine Unterschiede zwischen unbehandelten und mit Adeninnukleotid-behandelten Zellen zu erkennen. Die DNA der Zellen erscheint als eine einzige intakte Bande auf dem Agarosegel. Es sind keinerlei kleine DNA-Fragmente zu erkennen, die man in apoptotischen Zellen aufgrund des DNA-Abbaus durch Calcium/Magnesium-abhängige Nukleasen findet. Zum Vergleich ist die DNA-Degradation bei apoptotischen U937-Zellen gezeigt. Man erkennt keine einzelne DNA-Bande, sondern bedingt durch unterschiedliche DNA-Fragmentgrößen eine Verteilung über die gesamte Laufweite des Agarosegels. Im unteren Bereich läßt sich die typische DNA-Leiterbildung erkennen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Reversibilität der Adeninnukleotid-vermittelten Proliferationshemmung untersucht. Dazu wurden IEC-6 Zellen nach 24stündiger Applikation von 250 μ M ADP oder ATP oder 250 μ M β gMe-ATP gewaschen und 72 Stunden mit Kulturmedium ohne Zusätze inkubiert.

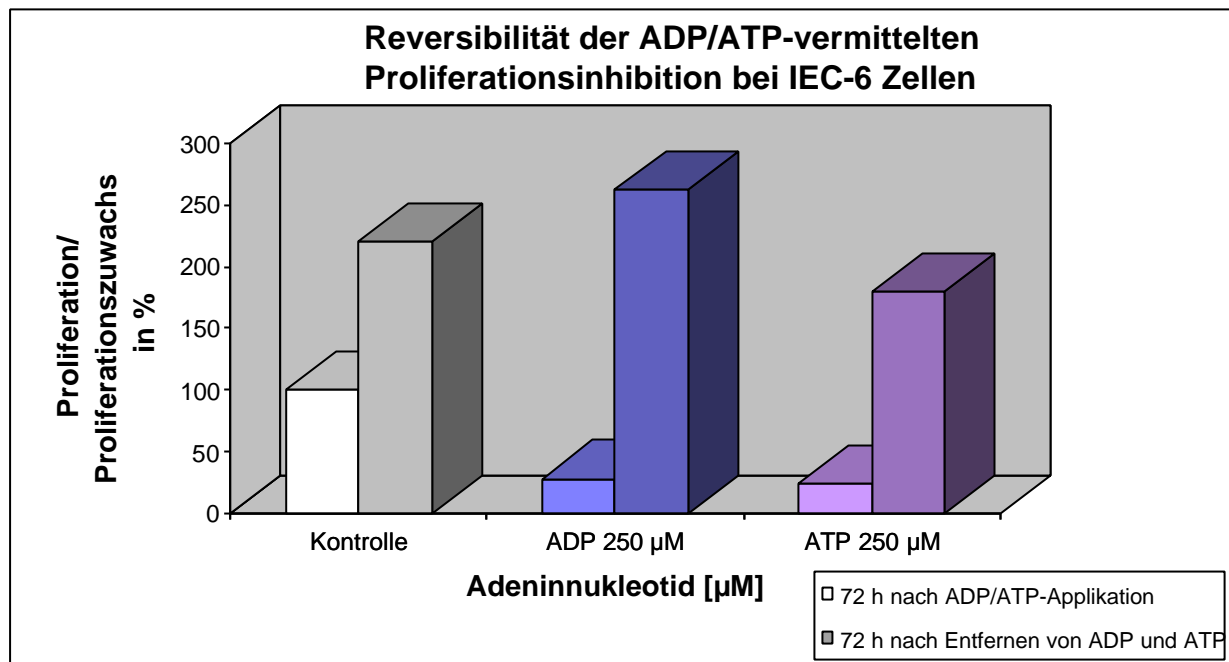


Abbildung 28: Untersuchung zur Reversibilität des proliferationshemmenden Effektes von ADP und ATP. $2,5 \times 10^4$ Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturschale pipettiert, und mit 250 µM Kontrollmedium oder 250 µM ADP oder ATP inkubiert. Parallel auf zwei Gewebekulturplatten wurde die Proliferation nach 72 h mit Hilfe eines MTT-Assays bestimmt oder aber die Zellen wurden von den Adeninnukleotiden befreit und zweimal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen. Anschließend wurden diese erneut mit Kulturmedium für 72 h inkubiert und die Proliferation gemessen. Der Proliferationszuwachs ausgehend von der Daten nach der Inkubation mit Adeninnukleotiden wurde in % bestimmt. Die Darstellung zeigt die Ergebnisse elffacher Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen.

Die in den **Abbildung 28** wiedergegebenen Ergebnisse belegen, daß die Proliferations-inhibition reversibel war. Nach Entfernen der Adeninnukleotide aus dem Kulturmedium kam es sehr schnell zu einer Zunahme der Proliferation. Der Proliferationszuwachs betrug zwischen 180 und 260% und übertraf damit sogar teilweise die Kontrolle. Dies mag darin begründet liegen, daß die Kontrolle aufgrund ihres anfänglich stärkeren Zellzuwachses den Punkt der Kontaktinhibition erreicht hatte. Die Daten belegen, daß die Adeninnukleotid-vermittelte Proliferationsinhibition nicht auf ein Absterben einer größeren Zahl von IEC-6 Zellen zurückzuführen ist und daß es sich bei dem beobachteten Vorgang um einen reversiblen Prozeß handelt.

Um auszuschließen, daß die durch den P2-Rezeptoragonisten $\beta\gamma$ Me-ATP vermittelte Proliferationshemmung - im Gegensatz zu der von den Adeninnukleotiden ADP und ATP hervorgerufenen Inhibition - einem anderen Mechanismus folgt, und nicht reversibel ist, wurden IEC-6 Zellen wiederum einer 72stündigen Inkubation mit 250 µM $\beta\gamma$ Me-ATP unterzogen. Nach Waschung der Zellen zur Entfernung von $\beta\gamma$ Me-ATP wurden die Zellen 72 Stunden in Kulturmedium ohne Zusätze inkubiert. Anschließend wurde die Proliferationsrate gemessen (**Abbildung 29**). Es ergaben sich die gleichen Resultate wie schon für zuvor untersuchtes ADP und ATP. Die Proliferationshemmung war auch für $\beta\gamma$ Me-ATP reversibel und beruhte nicht auf einer Beeinträchtigung der Vitalität der untersuchten Zellen.

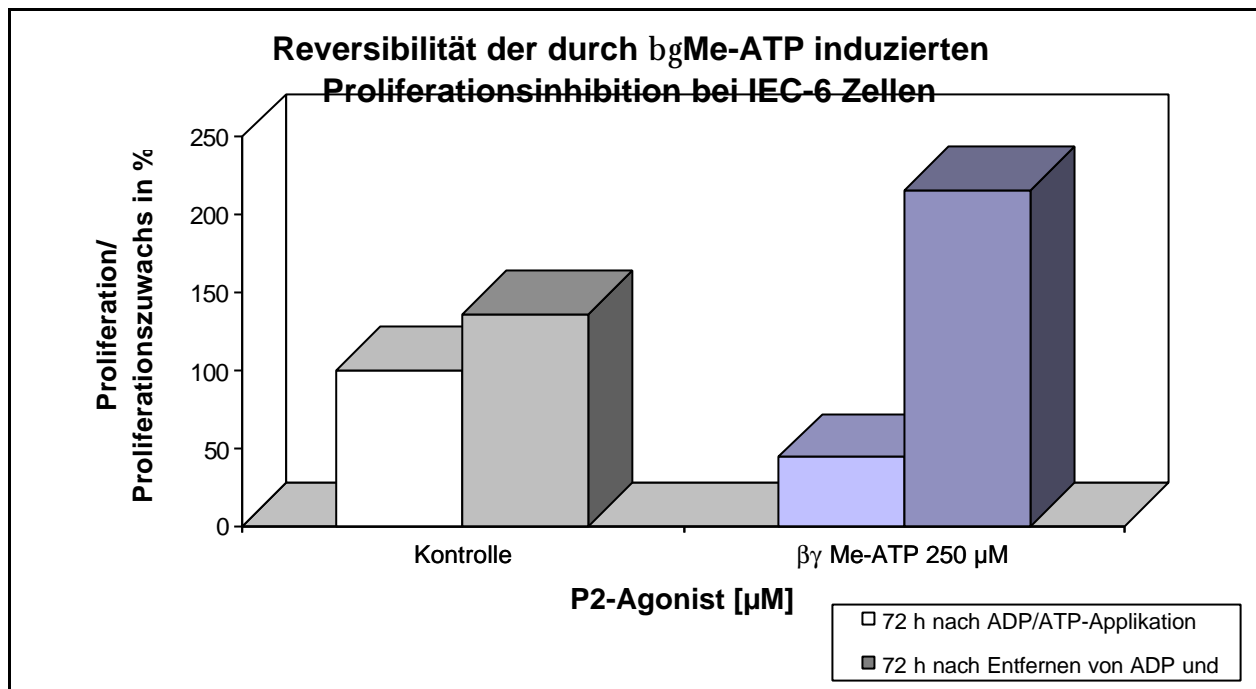


Abbildung 29: Untersuchung zur Reversibilität des proliferationshemmenden Effektes von $\beta\gamma$ Me-ATP. $2,5 \times 10^4$ Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturschale pipettiert und mit Kulturmedium ohne Zusätze oder mit 250 μM $\beta\gamma$ Me-ATP inkubiert. Parallel auf zwei Gewebekulturplatten wurde die Proliferation nach 72 h mit Hilfe eines MTT-Assays bestimmt oder aber das $\beta\gamma$ Me-ATP wurde von den Zellen entfernt und anschließend zweimal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen. Die Zellen wurden erneut mit Kulturmedium für 72 h inkubiert und die Proliferation gemessen. Der Proliferationszuwachs ausgehend von den Daten nach der Inkubation mit dem P2-Agonisten wurde in Prozent bestimmt. Die Darstellung zeigt die Ergebnisse drei- bis fünffacher Bestimmungen (Kontrolle) oder vier- bis achtfacher ($\beta\gamma$ Me-ATP) von drei unabhängigen Versuchen.

Die Untersuchungen zur Vitalität der IEC-6 Zellen nach Behandlung mit Adeninnukleotiden ergeben ein einheitliches Bild. Sowohl die Vitalitätsfärbung mit Trypanblau als auch die Untersuchung der DNA auf Fragmentierung durch Nukleasen geben keinerlei Anzeigung für eine erhöhte Letalität der Zellen oder die Beteiligung apoptotischer Vorgänge an der Proliferationsinhibition. Auch die Tatsache, daß die Wirkungen der Adeninnukleotide auf die intestinalen Epithelzellen reversibel sind, sprechen gegen toxische Effekte.

3.2 Modulation intestinaler Wundheilungsvorgänge durch extrazelluläre Matrifaktoren *in vitro*

Der Prozeß der intestinalen epithelialen Wundheilung wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Neben Wachstumsfaktoren, luminalen Nahrungsbestandteilen sowie darm-spezifischen und systemischen Hormonen sind auch Bestandteile der extrazellulären Matrix in diesen Vorgang involviert. Die extrazelluläre Matrix ist an der Adhäsion, Migration, Morphogenese und Differenzierung von intestinalen Epithelzellen beteiligt (Carroll et al. 1988; Hahn et al., 1990; Olson et al., 1991; Moore et al., 1994). Sie befindet sich in Form einer Basalmembran in direkter Nachbarschaft der Epithelzellen und grenzt diese von den darunterliegenden mesenchymalen

Zellen ab. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden die strukturellen Hauptkomponenten der intestinalen Basalmembran identifiziert. So sind Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin, Entactin/Nidogen und Heparansulfatproteoglycane an ihrem Aufbau beteiligt (Laurie et al.; 1982, Hahn et al., 1990). Untersuchungen von Trier et al. (1990) konnten zeigen, daß die Basalmembran den intestinalen Epithelzellen als Gerüst für die Migration dient, und es nicht zu einer synchronen Wanderung der Epithelzellen mit der darunterliegenden Basalmembran kommt. Vielmehr migrieren intestinale Mukosazellen bei gleichzeitiger Differenzierung aus der Kryptenregion heraus entlang der Basalmembran bis zu ihrem funktionellen Bestimmungsort, den Villusspitzen. Hierbei sind Interaktionen zwischen den Zellen und den Komponenten der extrazellulären Matrix essentiell für die epitheliale Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung (Beaulieu, 1992; Edelmann, 1992). Diese Interaktionen spielen aber nicht nur während der physiologischen Regeneration des Mukosaepithels eine entscheidende Rolle, sondern sie sind in besonderem Maße bedeutsam im Falle oberflächlicher Epithelzellverletzungen. Obwohl die Bedeutung der extrazellulären Matrixfaktoren hinlänglich akzeptiert ist, sind dennoch die Wechselwirkungen zwischen ihnen und den Zellen der intestinalen Mukosa nicht vollständig aufgeklärt.

3.2.1 Anwendbarkeit des Hexosaminidase-Adhäsionsassays zur Messung der Adhäsionsfähigkeit intestinaler Epithelzellen

Bei der Untersuchung intestinaler epithelialer Wundheilungsvorgänge unter dem Einfluß von extrazellulären Matrixbestandteilen müssen eine Reihe physiologischer Prozesse betrachtet werden. Direkt nach einer epithelialen Verletzung erfolgt die Migration unverletzter Zellen in den Wunddefekt sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Es handelt es sich hierbei um einen komplexen Prozeß bei dem die Zellen an der migratorischen Front morphologische Veränderungen durchmachen, die dann in der Adaption an einen migratorischen Phänotyp resultieren (Basson et al., 1992). Bedeutsam für die Migration sind hierbei die Ausbildung und Wiederauflösung von adhäsiven Kontakten. Die Zellen bilden sogenannte Adhäsionsplaques von zunehmender Anheftungsstärke in Zellbereichen migratorischer Aktivität. Hieraus entwickeln sich Kräfte und Spannung für die Migration. Einhergehend mit diesen Veränderungen können morphologische Modifikationen an den Zellen beobachtet werden. Hierzu gehören primär die Abflachung der Zellen und die Ausbildung dünner cytoplasmatischer Gebilde, die als Lammellipodien oder als Filopodien-artige Gebilde bezeichnet werden (Nusrat et al., 1992, Feil et al., 1987). Vor dem Hintergrund dieser morphologischen Veränderungen erscheint es sinnvoll, die Adhäsionseigenschaften von intestinalen Epithelzellen zu untersuchen, um ein besseres Verständnis für die Bedeutung der extrazellulären Matrixfaktoren bei den initialen Vorgängen der Wundheilung zu erlangen. Dies ist auch interessant, wenn man betrachtet, daß die Veränderung adhäsiver Interaktionen zu pathologischen Fehlfunktionen führen können (Clark & Brugge, 1995). Die Wirkung extrazellulärer Matrixfaktoren auf die Adhäsion von intestinalen Epithelzellen sollte ebenfalls mit Hilfe von IEC-6 Zellen charakterisiert werden, da die Untersuchung von Wundheilungsvorgängen dieser Zelllinie ein besonders gut charakterisiertes System darstellt, und IEC-6 Zellen eine Vielzahl der Charakteristika undifferenzierter Villuszellen aufweisen. Ihre

Eigenschaften wurden in Kapitel 3.1.1 eingehend beschrieben. Das Adhäsionsverhalten von IEC-6 Zellen wurde unter Zuhilfenahme eines kolorimetrischen Assays bestimmt. Dieser Adhäsionsassay beruht auf der Umsetzung eines p-Nitrophenolderivats durch ein ubiquitär vorkommendes lysosomales Enzym (2-Acetamido-2-deoxy- β -D-Glukosidacetamidodeoxyglukohydrolase = Hexosaminidase EC 3.2.1.30). Dieses von Banerjee und Basu (1975) beschriebene Enzym wurde von einer Vielzahl von Autoren zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Zellen eingesetzt (Rubin et al., 1979; Koponen et al., 1982; Landegren, 1984, Santoro et al., 1994). Da diese Methode bisher nicht zur Bestimmung der Adhäsion von IEC-6 Zellen eingesetzt wurde, war es zunächst notwendig, experimentell darzulegen, daß IEC-6 Zellen über dieses lysosomale Enzym verfügen und zur Umsetzung des Substrats befähigt sind. Da die Aktivität der Hexosaminidase in Zellen sehr verschieden sein kann (Santoro et al., 1994), war zunächst das Erstellen einer Kinetik für die Adhäsion der IEC-6 Zellen notwendig. **Abbildung 30** und **31** zeigen die Ergebnisse zur Findung einer geeigneten Adhäsionsdauer und Zellzahl.

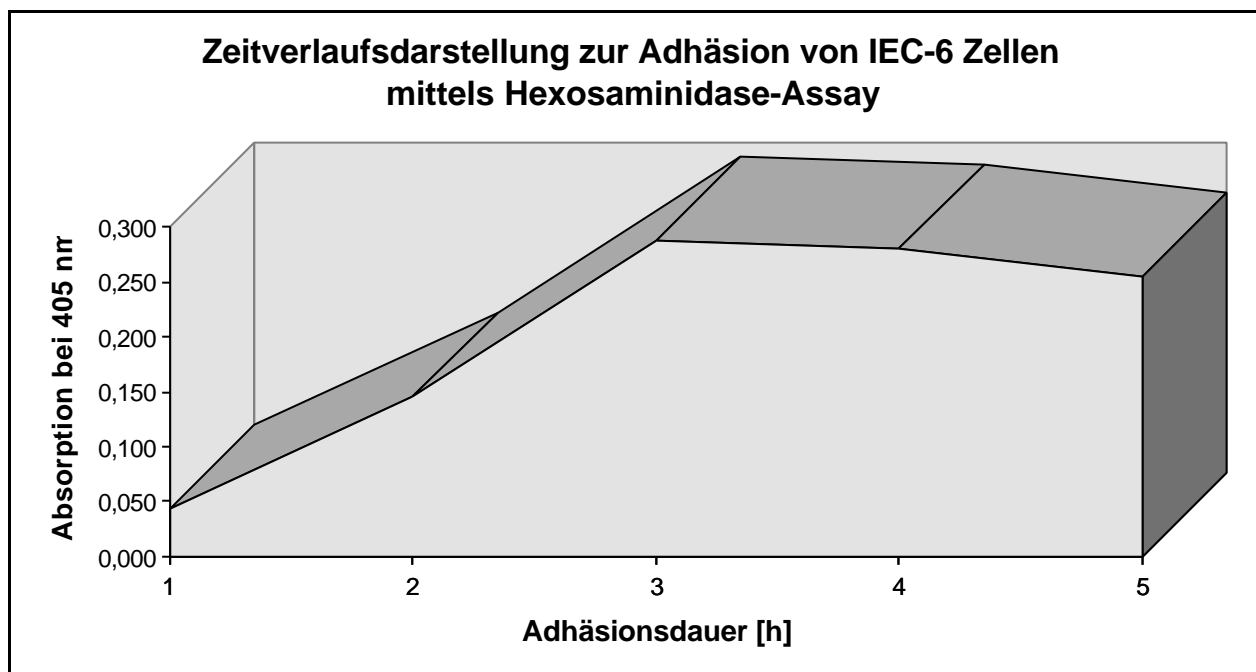


Abbildung 30: Untersuchung zur Bestimmung der geeigneten Adhäsionsdauer für IEC-6 Zellen im Hexosaminidase-Adhäsionsassay. $3,5 \times 10^4$ Zellen wurden unterschiedlich lang zur Adhäsion auf 96-well Gewebekulturschalen gegeben. Die Adhäsion wurde nach einer, zwei, drei, vier und fünf Stunden durch Absorptionmessung des umgesetzten Substrates ermittelt. Den Daten liegen die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen mit zehnfach Bestimmungen zugrunde.

Zunächst konnte anhand der durchgeführten Untersuchungen festgestellt werden, daß IEC-6 Zellen über die Hexosaminidase verfügen und die Umsetzung des Substrates bewirken können. Als Untersuchungszeitraum erwies sich eine Dauer von 3,5 Stunden als geeignet. Die Umsetzung des Substrates nahm mit zunehmender Dauer der Adhäsion zu und erreichte nach drei bis vier Stunden ihr Maximum. Eine längere Inkubationszeit bewirkte keine Erhöhung der Anzahl adhärenter Zellen. Nach Festlegung der geeigneten Dauer der Adhäsion wurde anschließend untersucht, ob eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten Zellzahl und der

Substratumsetzung existiert. **Abbildung 31** bestätigt diese lineare Beziehung. Das Bestimmtheitsmaß der Kurve zur Beschreibung der Linearität unterstreicht ebenfalls die Eignung zur Untersuchung von Adhäsionsvorgängen. Zudem unterscheiden sich die eingesetzten Zellzahlen eindeutig signifikant voneinander. Für die Adhäsionsuntersuchungen zum Einfluß extrazellulärer Matrixfaktoren wurden anhand der ermittelten Daten zwischen $1,5$ und $2,5 \times 10^4$ Zellen eingesetzt.

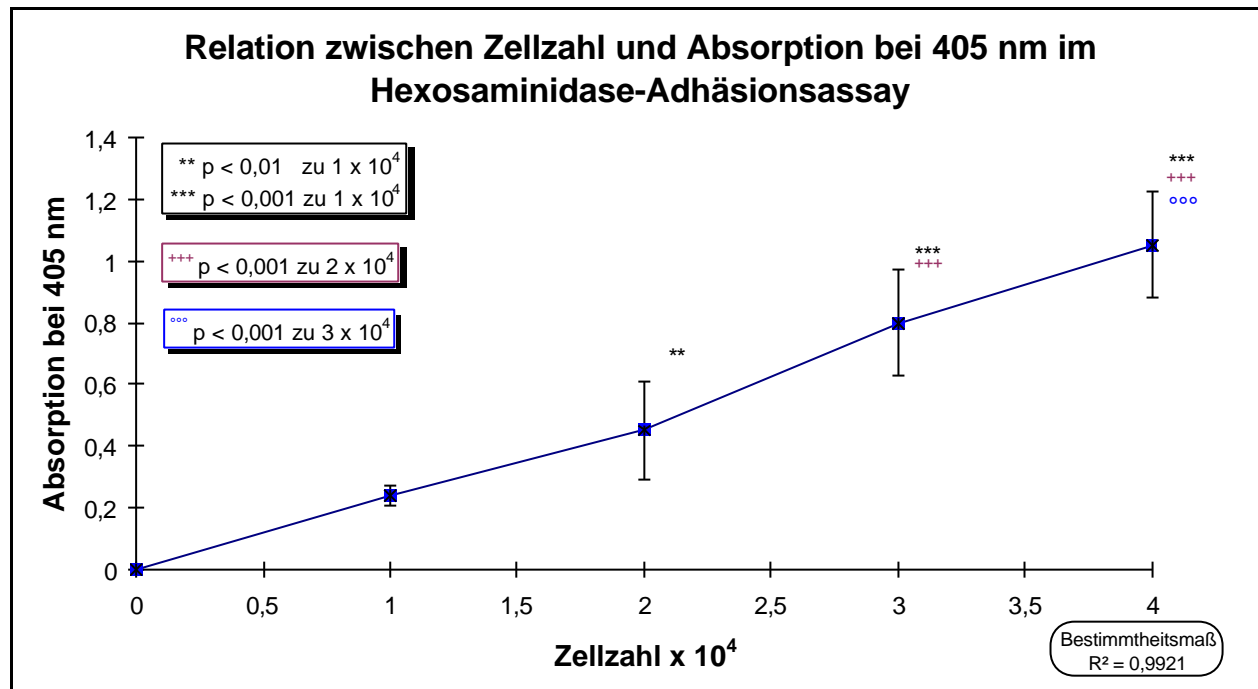


Abbildung 31: Darstellung des Verhältnisses zwischen Zellzahl und gemessener Absorption in einem colorimetrischen Farbassay. 1×10^4 bis 4×10^4 IEC-6 Zellen wurden wie in Material und Methoden beschrieben im Adhäsionsassay eingesetzt und für die Dauer von 3,5 h in den Vertiefungen der 96-well Gewebekulturplatten belassen. Nach dieser Inkubationsdauer wurden nicht adhärenente Zellen entfernt. Die verbliebenen adhärenierten Zellen wurden anhand der Umsetzung des Enzymsubstrates mittels Absorption bei 405 nm bestimmt. Die Daten wurden als fünffach Bestimmungen in drei unabhängigen Versuchen bestimmt. Zusätzlich zu den Signifikanzen ist in der Tabelle das Bestimmtheitsmaß der nicht eingezeichneten Regressionsgeraden angegeben.

3.2.2 Modulation der Adhäsionsfähigkeit von IEC-6 Zellen durch die Anwesenheit extrazellulärer Matrixfaktoren

Das intestinale Epithel ist gekennzeichnet durch eine hohe Dynamik. Innerhalb von wenigen Tagen kommt es zu einer vollständigen Erneuerung aller Epithelzellen der Mukosa. Dies bedeutet, daß es aufgrund des Verlustes ausdifferenzierter Enterozyten an den Villusspitzen zu einer ständigen Wanderung von Zellen entlang der Krypten-Villus Achse kommt (Podolsky, 1995). Dies gilt im besonderen Maße nach oberflächlichen Epithelzellverletzungen, die eine schnelle Regeneration der Mukosa zum Schutze des Organismus erfordern. Die Adhäsion von Epithelzellen an Komponenten der extrazellulären Matrix stellt einen initialen Schritt bei der Migration von Zellen und damit auch bei Wundheilungsvorgängen dar (Ruoslahti, 1991). Die extrazelluläre Matrix von intestinalen Epithelzellen hat die Gestalt einer Basalmembran, zu deren

Hauptkomponenten Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin zählen (Quaroni et al., 1978; Laurie et al., 1982). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß diese Komponenten der extrazellulären Membran in der Lage sind, die Adhäsion von Zellen zu modulieren. So konnte gezeigt werden, daß Rinderendothelzellen (BAEC = bovine aortic endothelia cells) eine erhöhte Anheftung an Fibronectin und Kollagen zeigen (Madri et al., 1988). Eine erhöhte Adhäsion an Laminin zeigen zum Beispiel epitheliale Zellen aus der Mausepidermis (Terranova et al., 1980). Auch für intestinale Zellen sind Modulationen der Adhäsion an verschiedene Matrices beschreiben. So demonstrierten Hahn et al. (1990), daß foetale intestinale Epithelzellen im Vergleich zur Anheftung an eine Plastikmatrix eine gesteigerte Adhäsion an Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin zeigen.

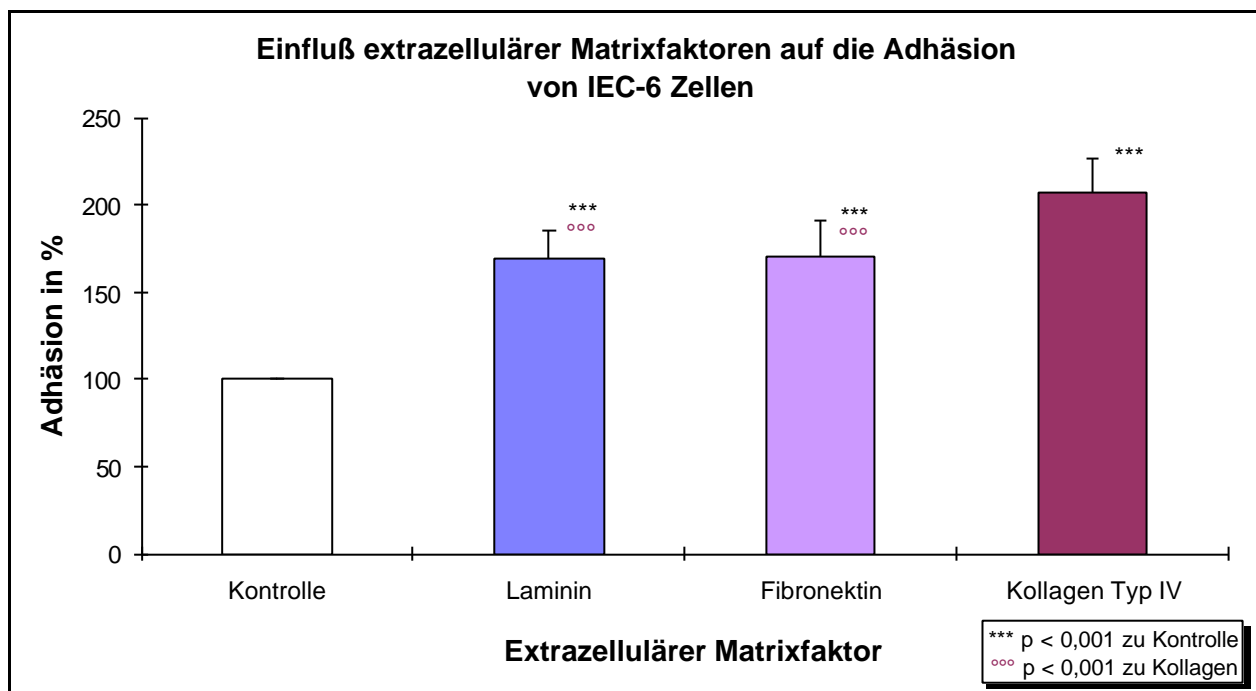


Abbildung 32: Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit von IEC-6 Zellen an Oberflächen, die zuvor mit extrazellulären Matrixfaktoren beschichtet worden waren. 2×10^4 Zellen in Kulturmedium wurden für die Dauer von drei Stunden in 96-well Gewebekulturschalen gegeben, die zuvor mit Laminin, Fibronectin, Kollagen Typ IV oder aber nicht (Kontrolle) beschichtet worden waren. Wie in Material und Methoden genauer erläutert wurde nach Zugabe des Substrates die Farbentwicklung im Photometer bei 405 nm gemessen. Den Daten liegen fünffach Bestimmungen von drei unabhängigen Versuchen zugrunde.

Die Untersuchung der Adhäsion von intestinalen Epithelzellen an extrazelluläre Matrixfaktoren konnte primär den Beweis erbringen, daß IEC-6 Zellen über Rezeptoren zur Bindung an Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin verfügen. Diesen Schluß läßt die Tatsache zu, daß die Adhäsion von IEC-6 Zellen an alle drei untersuchten Matrixfaktoren deutlich höher war als die Anheftung an eine unbeschichtete Plastikmatrix. **Abbildung 32** gibt die Ergebnisse der *In vitro* Adhäsionsuntersuchungen mit IEC-6 Zellen wieder. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied bei der Modulation der Anheftung zwischen den einzelnen Matrixfaktoren. So wurde die Adhäsion der intestinalen Zellen durch das Vorhandensein der Kollagen Typ IV-Matrix mit 207% im Vergleich zu den Kontrollen am stärksten gefördert. Laminin und Fibronectin (je 170%) bewirkten ebenfalls eine Adhäsionssteigerung, die aber signifikant kleiner war, als die durch Kollagen Typ IV

vermittelte. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, daß IEC-6 Zellen Adhäsionsrezeptoren besitzen, die ihnen eine Anheftung an die drei Hauptkomponenten der Basalmembran intestinaler Epithelzellen erlauben. Zudem bewirken diese Bestandteile der extrazellulären Matrix adhäsionsfördernde Eigenschaften, die am deutlichsten bei Kollagen Typ IV ausgeprägt sind.

3.2.3 Effekte ausgewählter extrazellulärer Matrifaktoren auf die Migration intestinaler Epithelzellen der Ratte

Die in 3.2.2 untersuchte Adhäsion von intestinalen Epithelzellen an die extrazelluläre Matrix ist mitverantwortlich für die Migration von Zellen, die wiederum einen entscheidenden Prozeß für die Wiederherstellung des intestinalen Epithels darstellt. Obwohl lange Zeit die Rolle der Proliferation bei der intestinalen Reepithelialisierung in den Mittelpunkt der Betrachtung gestellt worden war (Lipkin, 1987), mußte man aufgrund von *in vitro* und *in vivo* Beobachtungen feststellen, daß die Schnelligkeit mit der das intestinale Epithel regenerieren kann, nicht allein auf Proliferationsvorgänge zurückgeführt werden kann. Schon 1981 beobachtete Powell, daß die Reparatur der Magenschleimhaut von Meerschweinchen zu schnell abgeschlossen war, daß sie allein durch eine gesteigerte Proliferation erklärt werden konnte. Auch Feil et al. (1987) und Moore et al. (1988) beobachteten die Wiederbesiedelung der Dünndarmmukosa nach Säurebedingter Verletzung innerhalb weniger Stunden. Lacy et al. konnten 1988 demonstrieren, daß die Migration den initialen Schritt bei der Wundheilung oberflächlicher Verletzungen darstellt, der Minuten nach der Verletzung beginnt und in Stunden abgeschlossen sein kann. Des weiteren konnte diese Arbeitsgruppe die Unabhängigkeit der epithelialen Migration von der Proliferation darlegen. Fortan betrachtete man die epitheliale Restitution als die Abfolge initialer Migrationsvorgänge und sich anschließender Proliferations- und Differenzierungsereignisse. Die Entwicklung eines *In vitro* Wundheilungsmodells für IEC-6 Zellen von McCormack et al. (1992) erlaubte eine gezielte Untersuchung der epithelialen Migrationsvorgänge und stellt eines der am besten charakterisierten Systeme dar (Dignass et al., 1993; 1994a und b). Dennoch ist es nicht möglich die Zellmigration auf extrazellulären Matrixfaktoren mit diesem *In Vitro* Wundheilungsmodell zu realisieren, da die Verwendung von Rasierklingen zu einer Verletzung der Matrix führen kann. Daher war es erforderlich ein geeigneteres Untersuchungssystem zu entwickeln, welches gewährleistet, daß die aufgetragenen Matrixfaktoren unbeschädigt bleiben. Als Anleitung diente ein von Pratt et al. (1984) entwickeltes Modell, welches die Bestimmung der Migration von Aorta-Endothelzellen (BAEC) auf Fibronektin und Kollagen I/III unter der Verwendung von Teflonzylindern untersucht. Dieses Modell wurde von Basson et al. (1992) auch bei Experimenten mit humanen Kolonenterozyten verwandt. In Anlehnung an dieses Modell wurden mit Hilfe der Feinwerkstatt der Tumorforschung des Universitätsklinikums Essen Zylinder aus rostfreiem Stahl hergestellt. Anders als bei dem von Pratt et al. (1984) entwickelten Modell betrug der Innendurchmesser des Zylinders, in dem die Zellen bis zur Konfluenz angezüchtet wurden, nur 3 mm. Zur Unterscheidung und aufgrund der Tatsache, daß es in dem vorgestellten Modell nicht zu einer Verletzung von Zellen kommt, wurde diese Untersuchungsmethode als *In Vitro* Migrationsmodell bezeichnet. Das Ausschließen einer Verletzung von Zellen stellt einen wesentlichen Vorteil des Modells dar, da wie zuvor beschrieben

und anhand der Ergebnisse in 3.1 dokumentiert, viele der von verletzten Zellen freigesetzten Substanzen einen Einfluß auf die Migration von IEC-6 Zellen ausüben können und damit die Experimente sekundären, nicht genauer definierbaren Einflüssen ausgesetzt wären. **Abbildung 33** dokumentiert den Zustand des Zellayers nach Entfernen der Zylinder.

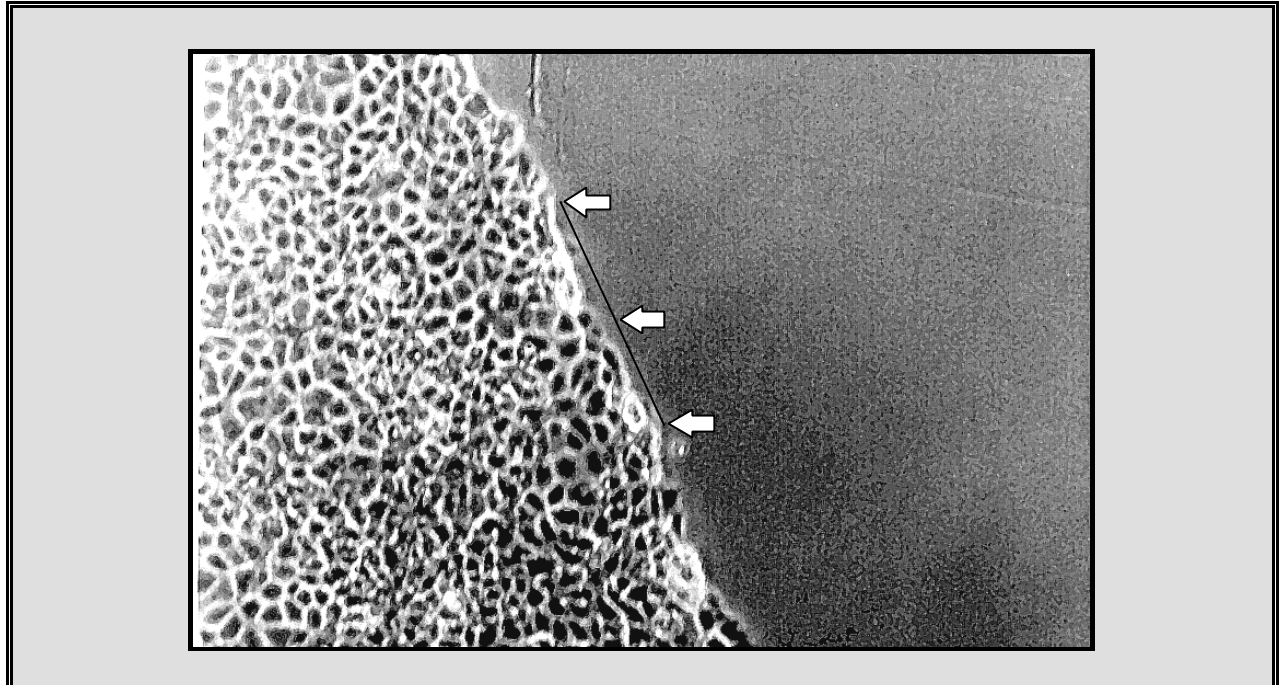


Abbildung 33: Untersuchung der Migration von IEC-6 Zellen in einem In vitro Migrationsmodells mit Hilfe von Stahlzylindern

Zur Untersuchung der Migration auf extrazellulären Matrixfaktoren wurden IEC-6 Zellen in Stahlzylindern angezüchtet. Die photographische Abbildung des mikroskopischen Bildes bei 100facher Vergrößerung zeigt die Begrenzung des Monolayers direkt nach der Entfernung des Stahlzylinders. Der Rand wurde mit einem wasserfesten Stift markiert (→), um später den Startpunkt für eine Rasterzählung zu erkennen. Die schwarze Linie zeigt, wie das im Okular befindliche Gitternetz bei der Auszählung ausgerichtet wurde.

Obwohl der Zellrand nicht so gleichmäßig verläuft, wie in dem zuvor beschriebenen *In Vitro* Wundheilungsmodell, ist dennoch eine eindeutige Begrenzung der Zellen gewährleistet. Die Quantifizierung der Ergebnisse wurde anhand eines eigens entwickelten Schemas vorgenommen. Dabei wurde zunächst die ursprüngliche Begrenzung des Monolayers mit Hilfe eines Stiftes auf der Unterseite der Zellkulturschalen markiert. An diesen Punkt wurde - in **Abbildung 33** in Form einer Linie dargestellt - ein in das Okular des Mikroskops eingebrachtes Gitternetz mit zehn Zonen angelegt. Der Migrationsursprung ist in den **Abbildungen 34A** und **B** als roter Pfeil wiedergegeben. 24 Stunden später wurden dann die Zellen in den einzelnen Zonen ausgezählt.

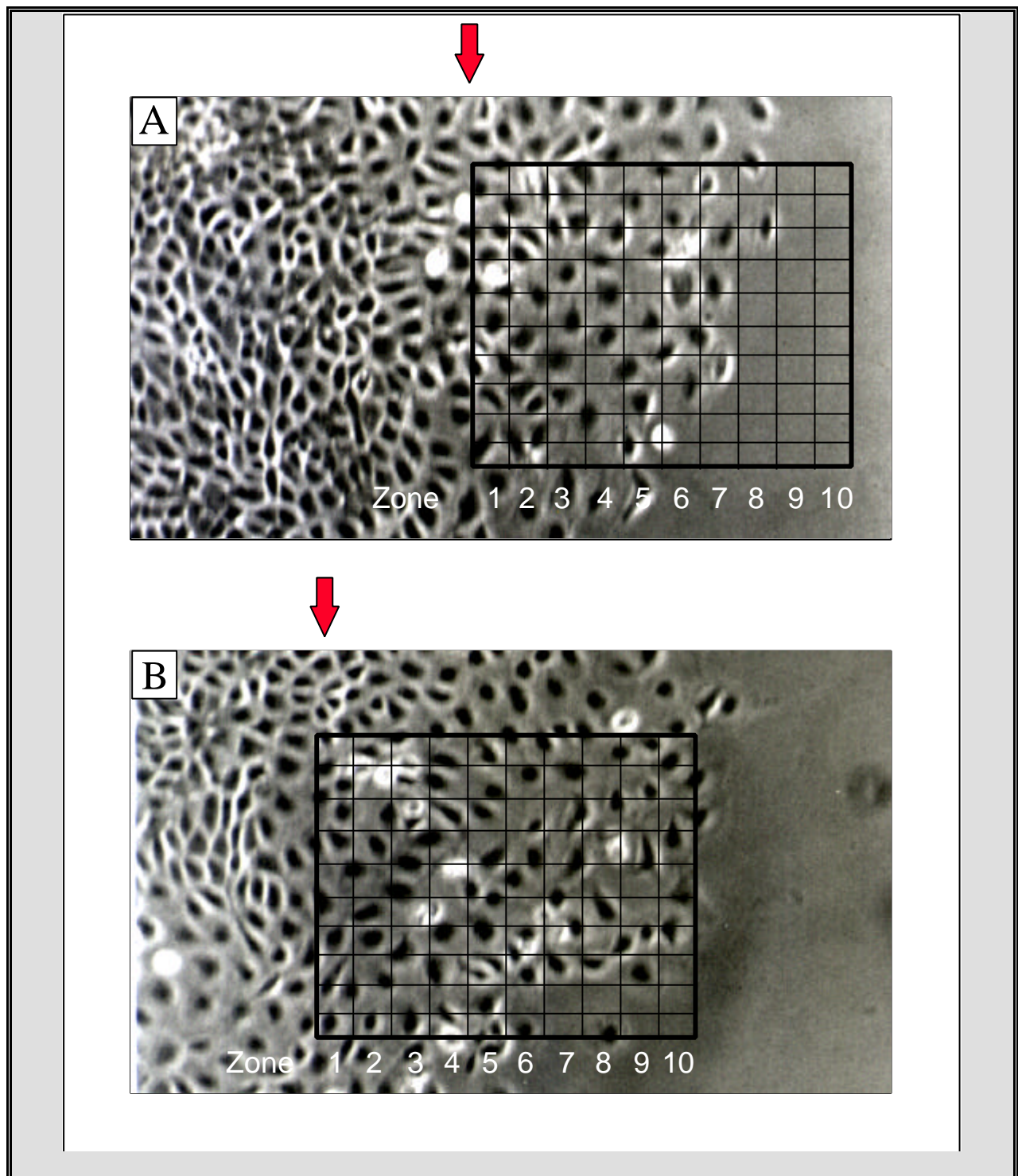


Abbildung 34: Untersuchung der Migration von IEC-6 Zellen auf extrazellulären Matrixfaktoren in einem In vitro Migrationsmodells mit Hilfe von Stahlzylindern

Die Abbildungen **A** und **B** zeigen die Migration der IEC-6 Zellen 24 h nach Entfernung der Stahlzylinder. Die eingezeichneten Raster verdeutlichen das Bild, welches sich bei der mikroskopischen Betrachtung mit im Okular eingelegten Raster ergibt. Die roten Pfeile (↓) markieren die Begrenzung der IEC-6 Monolayer nach Entfernung der Stahlzylinder. Beide Aufnahmen sind bei 100facher Vergrößerung aufgenommen. Abbildung **A** zeigt die Migration ohne extrazellulären Matrixfaktor, Abbildung **B** die Migration der Zellen auf Kollagen Typ IV. Die Anzahl der Zellen in jeder Zone wurde bei Betrachtung des mikroskopischen Bildes bestimmt.

In **Abbildung 34A** und **B** lassen sich deutliche Unterschiede bei der Migration von IEC-6 Zellen auf einer Plastikmatrix und Kollagen IV erkennen. Die intestinalen Epithelzellen ohne extrazelluläre Matrix wanderten bis in die Zonen 5-7, einige wenige auch bis zur Zone 8, während IEC-6 Zellen auf Kollagen IV auch die Zonen 8-10 oder sogar darüber hinaus liegende Bereiche erreichten. Die Verhältnisse der Fotografien werden auch in den graphischen Darstellungen wiedergegeben.

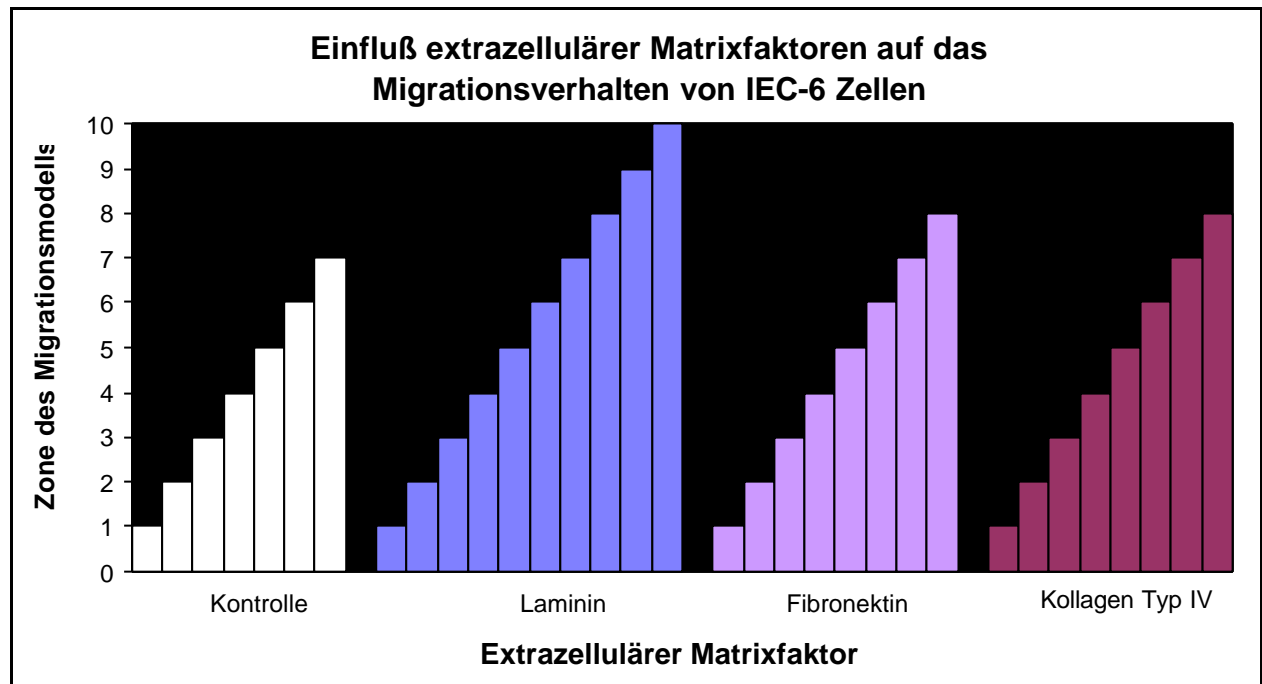


Abbildung 35: Migrationsverhalten von IEC-6 Zellen unter dem Einfluß verschiedener Matrixfaktoren. IEC-Zellen wurden in einem Stahlzylinder bis zur Konfluenz angezüchtet wie in Material und Methoden beschrieben. Die Graphik stellt die Migration der IEC-6 Zellen nach Entfernen des Zylinders dar. Differenziert wurde hier nur das Erreichen einer definierten Zone. Zone 1 lag hierbei am nächsten, Zone 10 am weitesten vom Migrationsursprung entfernt. Zusammengefaßt sind die Daten von sechsfachen Bestimmungen drei unabhängiger Versuche. Werte < 1 wurden als Nichterreichen der Migrationszone gewertet.

Abbildung 35 dokumentiert, daß die untersuchten Zellen im Durchschnitt eine bestimmte Zone erreichen können oder nicht. So zeigte sich ohne Berücksichtigung der Anzahl, daß Zellen ohne extrazelluläre Matrix maximal bis in die siebte Zone vordrangen, IEC-6 Zellen auf Fibronectin oder Kollagen IV bis zur Zone 8 und auf Laminin sogar bis Zone 10 migrierten.

Eine differenzierte Aussage über das Migrationsverhalten ist in den **Abbildungen 36** und **37** dargestellt. Erstere erlaubt eine Betrachtung der Zellen, die sich direkt am Migrationsursprung befanden. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den intestinalen Epithelzellen, die ohne extrazelluläre Matrix migrierten (Kontrolle) und Zellen, die über Laminin, Kollagen IV oder Fibronectin wanderten. Die Anzahl der Zellen, die sich direkt am "Startpunkt" der Migration befanden, war in den Kontrollen am höchsten. Betrachtet man Beschreibungen der Migration von intestinalen Epithelzellen in der Literatur, so wird als ein initialer Schritt dieses Vorgangs die Abflachung der Zellen beschrieben, die mit einer Bildung Lammellipodien-ähnlicher Gebilde

einhergeht (Nusrat et al., 1992). Die Zellen nutzen ihre maximale Oberfläche zur Abdeckung der zellfreien Bereiche (Moore et al., 1989). Ausgehend von diesen Beschreibungen, erlaubt die Untersuchung der Zellen in Zone 1 des dargestellten Modells eine Interpretation der Ausbreitungszunahme der Zellen; dieses wird in der Literatur häufig als "spreading" bezeichnet.

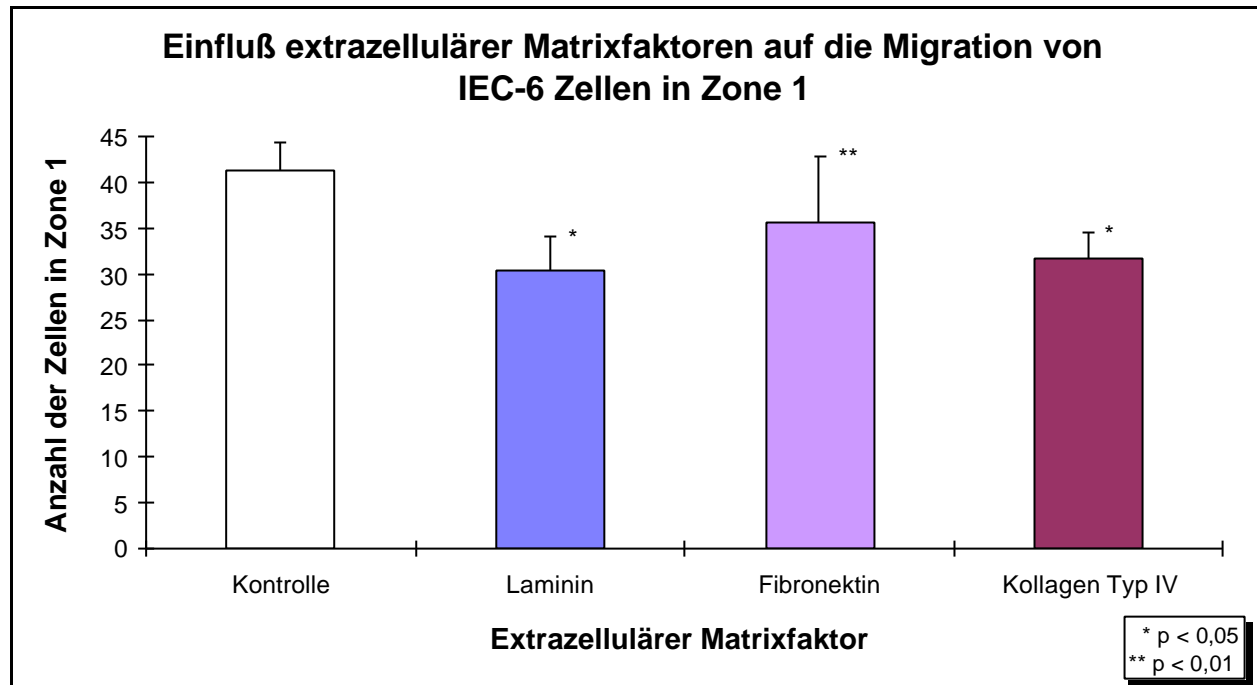


Abbildung 36: Migrationsverhalten von IEC-6 Zellen unter dem Einfluß verschiedener Matrixfaktoren. IEC-Zellen wurden in einem Stahlzylinder bis zur Konfluenz angezüchtet wie in Material und Methoden beschrieben. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen in der Zone 1, die sich am nächsten zum Migrationsursprung befindet. Die Daten sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils sechsfacher Bestimmung.

Abbildung 36 gibt wieder, daß IEC-6 Zellen auf den Matrixfaktoren Laminin und Kollagen Typ IV eine eindeutig signifikante und auf Fibronectin eine signifikante Zunahme der Ausbreitung nahe des Migrationsbeginns aufwiesen. Untersuchungen der Zonen 6-10 erlauben weitere Aussagen bezüglich des Wanderungsverhaltens von IEC-6 Zellen auf unterschiedlichen extrazellulären Matrixfaktoren. **Abbildung 37** gibt die Anzahl der Zellen in den weiter vom Ursprung der Migration entfernten Regionen wieder. Die Auswertung dieser Daten erlaubt damit eine Aussage über die Geschwindigkeit der Migration. So ist die Migration der intestinalen Epithelzellen auf Laminin deutlich größer als auf allen anderen untersuchten Matrixfaktoren und unterscheidet sich zudem hoch signifikant von der Kontrolle. Auch für Fibronectin und Kollagen konnte eine eindeutig signifikante bzw. signifikante Erhöhung der Migration beobachtet werden. Faßt man die erhobenen Daten zusammen, so sind extrazelluläre Matrixfaktoren in der Lage, daß Migrationsverhalten von IEC-6 Zellen zu modulieren. Sie verändern die Ausbreitung der Zellen und stimulieren die Geschwindigkeit des Migrationsvorgangs *in vitro*. Hierbei erweist sich der extrazelluläre Matrixfaktor Laminin vor Fibronectin und Kollagen Typ IV als am wirksamsten.

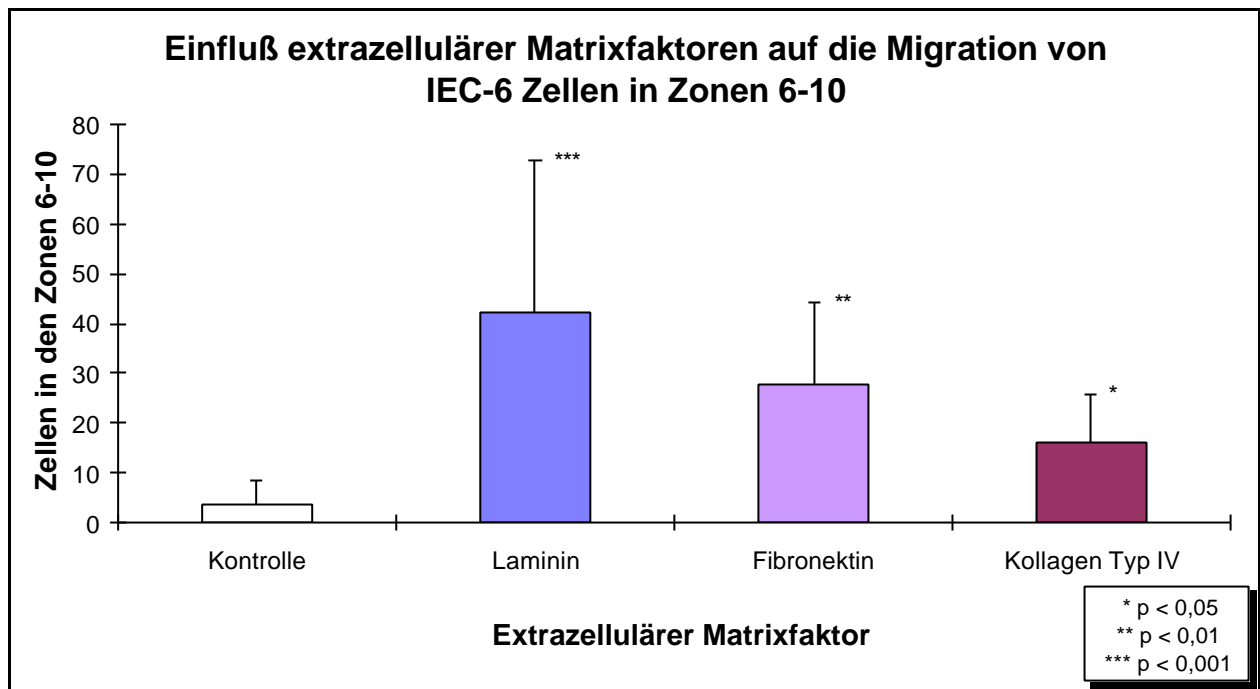


Abbildung 37: Migrationsverhalten von IEC-6 Zellen unter dem Einfluß verschiedener Matrixfaktoren. IEC-Zellen wurden in einem Stahlzylinder bis zur Konfluenz angezüchtet wie in Material und Methoden beschrieben. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen in den Zonen 6-10, wobei Zone 10 die am weitesten vom Migrationsursprung entfernte Zone darstellt. Die Daten sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils sechsfacher Bestimmung.

3.2.4 Zeitabhängiger Einfluß der extrazellulären Matrixfaktoren Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV auf die Proliferation von IEC-6 Zellen

Die epitheliale Restitution erfordert neben den in den Kapiteln zuvor beschriebenen Adhäsions- und Migrationsvorgängen auch die Proliferation der Epithelzellen, um den Zellpool, der durch den Verlust ausdifferenzierter Zellen in das Gastrointestinallumen oder aber Verletzungen verringert wurde, wieder zu komplettieren. Das intestinale Epithel ist gekennzeichnet durch eine extrem hohe Umsatzrate, die zu den schnellsten im Organismus von Vertebraten gehört, und in den meisten Lebewesen zwischen 24 und 72 Stunden beträgt (Quaroni et al., 1979; Potten et al., 1992). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß extrazelluläre Matrixfaktoren in der Lage sind die Proliferation von Zellen zu modulieren. Dies wird vor allen Dingen auch im Zusammenhang mit einer parallelen Differenzierung beobachtet (Kleinmann et al., 1987; Laurie et al., 1989; Hahn et al., 1990). Madri et al (1988) konnten zum Beispiel zeigen, daß die Proliferation von Rinderendothelzellen aus Aorten (BAEC) *in vitro* durch die Anwesenheit von extrazellulären Matrixfaktoren verändert wird. Auch Studien von Basson et al. (1992) beschrieben Einflüsse von Bestandteilen der Basalmembran auf die Vermehrung von Caco-2 Zellen.

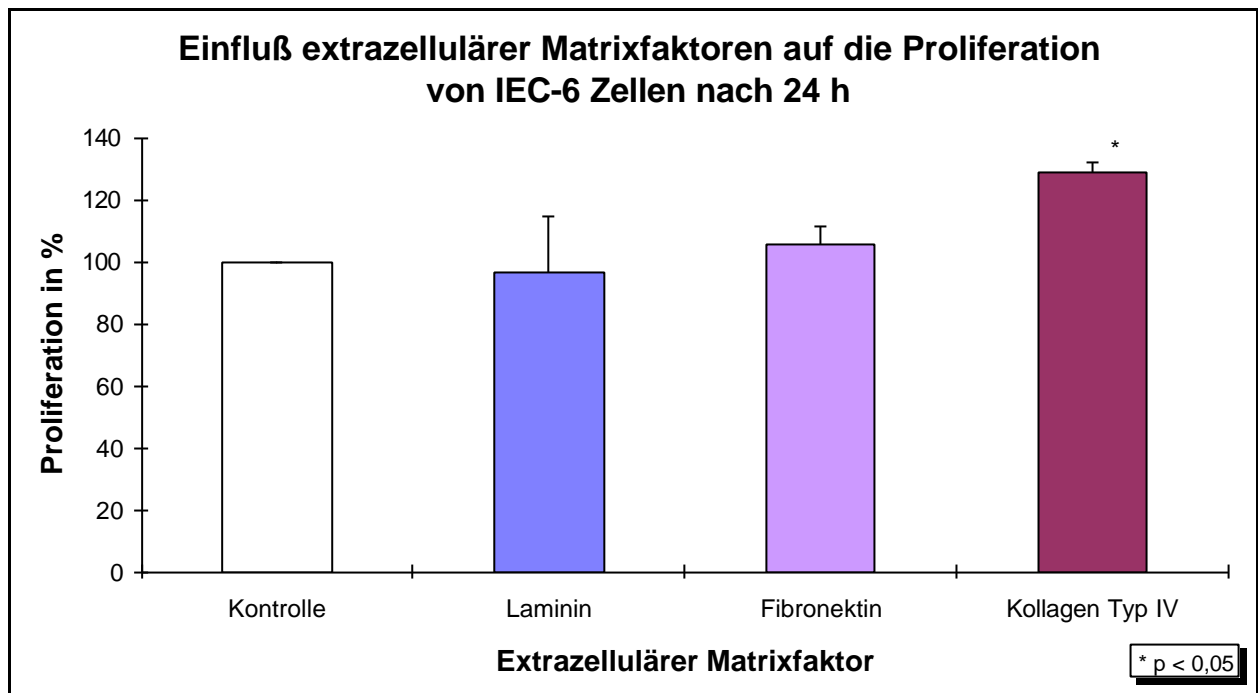


Abbildung 38: Einfluß extrazellulärer Matrixfaktoren auf die Proliferation von IEC-6 Zellen. Der Beobachtungszeitraum für die Proliferationsmessung betrug 24 Stunden. $3,5 \times 10^4$ Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturschale pipettiert, die zuvor mit entsprechenden Matrixfaktoren beschichtet worden war. Mit Hilfe eines MTT-Assays wurde die Proliferation, wie in Material und Methoden genauer erläutert, bestimmt. Den Daten liegen die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen mit vier- bis achtfach Bestimmungen zugrunde.

In einem Kaninchenmodell, welches die Proliferation von Magenzellen untersucht, modulierten Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin die epitheliale Proliferation. Diese Untersuchung konnte zudem zeigen, daß Proliferationsveränderungen zeitabhängig erfolgen können (Mikami et al., 1994).

Daher wurden zur Untersuchung der Proliferation von IEC-6 Zellen verschiedene Zeitpunkte zur Bestimmung der Zellwachstumsrate gewählt, die mit 24-72 Stunden ungefähr den kompletten Erneuerungszyklus der intestinalen Epithelzellen umspannen. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sind in den **Abbildungen 38 bis 40** wiedergegeben. Nach 24 Stunden (**Abbildung 38**) war die IEC-6-Zellproliferation auf den Laminin- und Fibronectin-beschichteten Zellkulturplatten unverändert im Vergleich zu der Kontrolle. Für Kollagen Typ IV konnte eine Stimulation der epithelialen Proliferation auf 129% im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden.

Nach einem Untersuchungszeitraum von 48 Stunden (**Abbildung 39**) blieb die Proliferationsstimulation für IEC-6 Zellen, die auf einer Kollagen IV-Matrix gewachsen waren, erhalten. Auch die Höhe der Stimulation veränderte sich mit einem Wert von 131% nicht wesentlich. Eine signifikante Proliferationssteigerung konnte nach zwei Tagen auch bei den Zellen beobachtet werden, die mit einer Fibronectin-Matrix inkubiert worden waren.

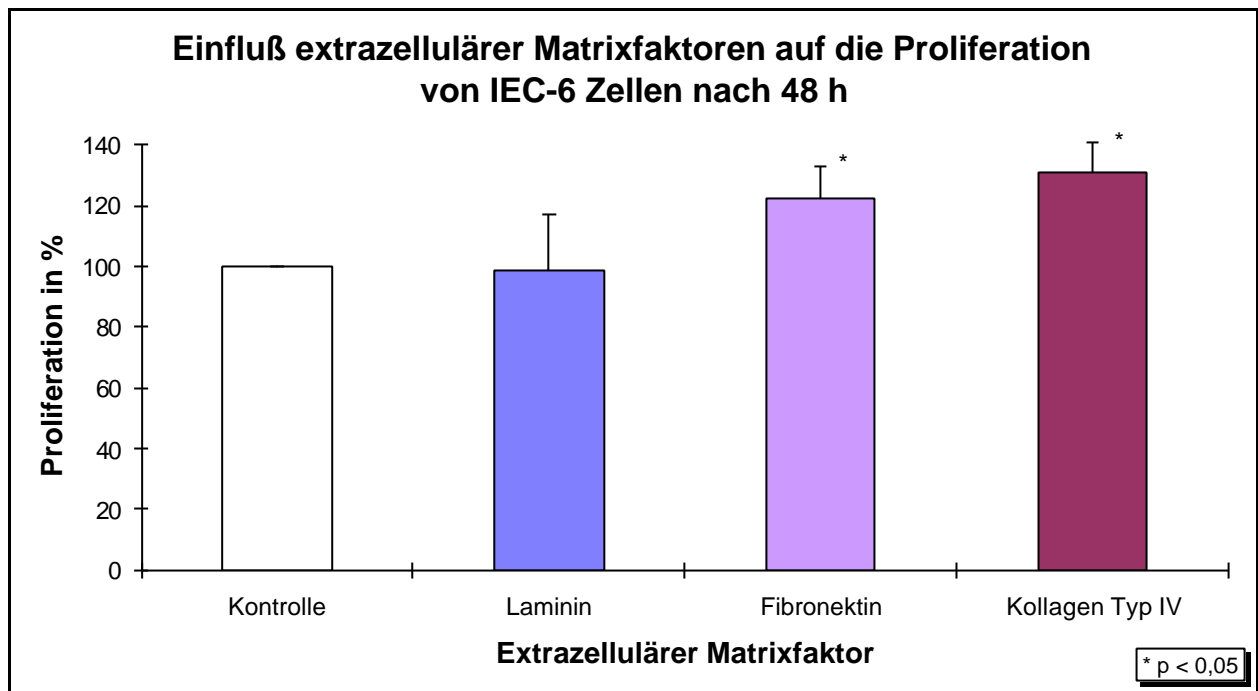


Abbildung 39: Einfluß extrazellulärer Matrixfaktoren auf die Proliferation von IEC-6 Zellen. Der Beobachtungszeitraum für die Proliferationsmessung betrug 48 Stunden. 3×10^4 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturschale pipettiert, die zuvor mit entsprechenden Matrixfaktoren beschichtet worden war. Mit Hilfe eines MTT-Assays wurde die Proliferation, wie in Material und Methoden genauer erläutert, bestimmt. Den Daten liegen die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen mit vier- bis achtfach Bestimmungen zugrunde.

Diese lag mit 122% allerdings unter der in Anwesenheit von Kollagen IV beobachteten Stimulation. Laminin bewirkte keinerlei Veränderung der epithelialen Zellproliferation in den *in vitro* Versuchen mit IEC-6 Zellen nach 48 Stunden. Die Betrachtung der Proliferation nach 72 Stunden, die in **Abbildung 40** wiedergegeben ist, zeigte dann ein völlig anderes Bild als die Bestimmungen nach 24 und 48 Stunden. Fibronectin übte keinen Einfluß auf die intestinale Proliferation mehr aus und Kollagen IV bewirkte nur noch eine leichte, jedoch nicht mehr signifikante Proliferationssteigerung. Dagegen war Laminin in der Lage, die Proliferation eindeutig signifikant zu inhibieren. Die Proliferation der IEC-6 Zellen wurde im Vergleich zu der Kontrolle um ungefähr 40% auf 63% reduziert.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die extrazelluläre Matrix in der Lage ist, die intestinale epitheliale Proliferation von IEC-6 Zellen in einem *In vitro* Proliferationsmodell zu modifizieren. In den durchgeführten Untersuchungen wirkten alle verwendeten Matrixfaktoren modulierend. Kollagen IV, Fibronectin und Laminin zeigten Veränderungen der Proliferation, die sich je nach Untersuchungszeitraum deutlich voneinander unterschieden. Kollagen Typ IV und Fibronectin erwiesen sich als Proliferationsstimulatoren, Laminin dagegen als Inhibitor.

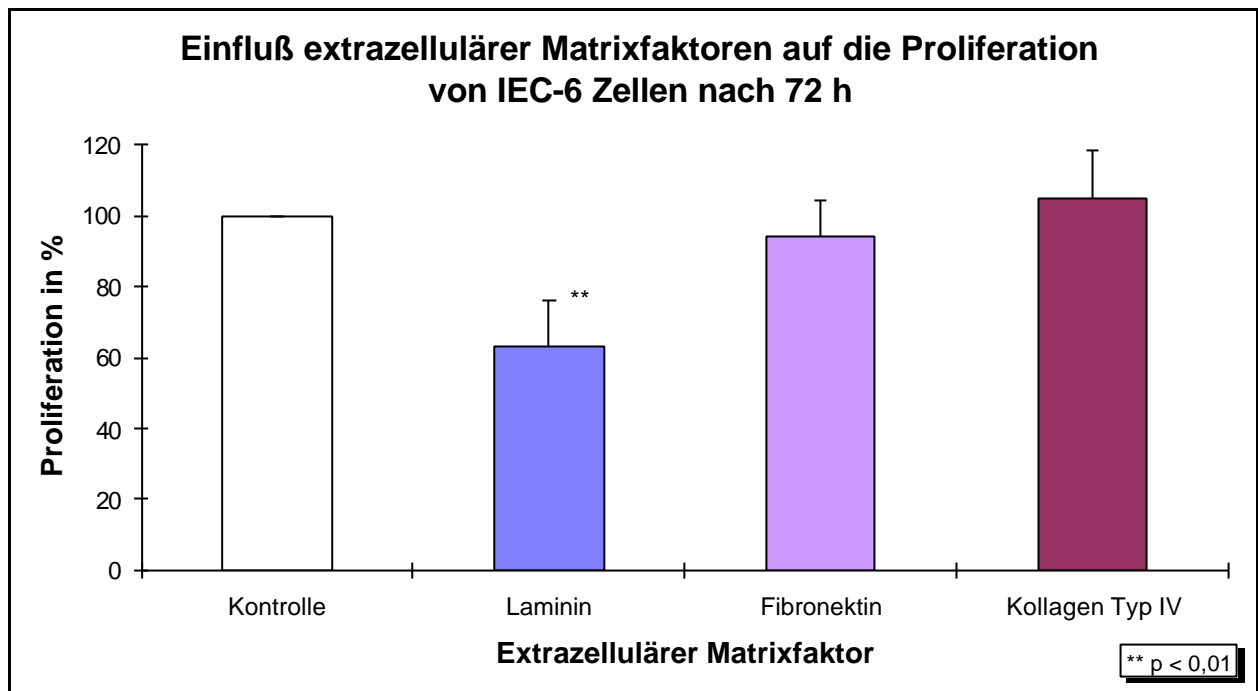


Abbildung 40: Einfluß extrazellulärer Matrixfaktoren auf die Proliferation von IEC-6 Zellen. Der Beobachtungszeitraum für die Proliferationsmessung betrug 72 Stunden. 2×10^4 Zellen wurden in jede Vertiefung einer 24-well Gewebekulturschale pipettiert, die zuvor mit entsprechenden Matrixfaktoren beschichtet worden war. Mit Hilfe eines MTT-Assays wurde die Proliferation, wie in Material und Methoden genauer erläutert, bestimmt. Den Daten liegen die Ergebnisse von sieben unabhängigen Versuchen mit vier- bis achtfach Bestimmungen zugrunde.

3.2.5 Semiquantitative PCR-Analyse der Expression von TGF β in intestinalen Epithelzellen nach Wachstum auf Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV

Die in den Kapitel 3.2.1 bis 3.2.4 dargelegten Ergebnisse belegen eine Modulation der entscheidenden Prozesse der intestinalen Wundheilung, wie der epithelialen Adhäsion, Migration und Proliferation durch extrazelluläre Matrixfaktoren. Da die Signalübertragungsmechanismen extrazellulärer Matrixfaktoren nicht vollständig geklärt sind, kann über die Wirkungsvermittlung von Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin in intestinalen Epithelzellen bisher nur spekuliert werden. Als sicher gilt aber die Beteiligung von Integrinen. Diese Moleküle, deren Funktion man zunächst im wesentlichen in der Verankerung der Zellen in der Basalmembran vermutete, werden heute als Rezeptoren verstanden, die für die bidirektionale Vermittlung von Signalen aus der Zelle heraus (inside-out signaling) und in die Zelle hinein (outside-in signaling) verantwortlich sind (Hynes, 1992). Die Integrine stellen die wesentlichen Rezeptoren von Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und vielen anderen Komponenten der extrazellulären Matrix dar. Die Informationsvermittlung der Integrine ist vielfältig. Sie beinhaltet direkte Wirkungen auf das Cytoskelett von Zellen, ein Aspekt, der für die Wundheilung von Bedeutung sein könnte (Miyamoto al., 1995). Desweiteren ist auch die Aktivierung von Wachstumsfaktor-regulierten Signalwegen, wie z.B. MAP-Kinase-abhängige Informationsvermittlung beobachtet worden

(Clark & Brugge, 1995). Daher ist es denkbar, daß die Bindung extrazellulärer Matrixfaktoren an Integrine Signalkaskaden aktiviert, die letztendlich in einer Veränderung der Expression von Genen resultiert. Diese Möglichkeit diskutiert auch Podolsky (1995), der annimmt, daß die unterschiedliche Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im Dünndarm und Kolon einen Mechanismus darstellen könnte, der in der Lage ist, die Cytokin-produktion zu modulieren. Der Basalmembran käme demnach keine statische, sondern eine dynamische Rolle bei der Modulation intestinaler Reparaturvorgänge zu. Diese Annahme wird durch Beobachtungen von Gressner & Wulbrand (1997) unterstützt, die zeigen konnten, daß die Expression von TGF β in Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der angebotenen Matrix variiert. In Bezug auf die vorliegenden Untersuchungen scheint dies besonders interessant, da TGF β umfangreiche Wirkungen auf das intestinale Epithel ausübt. So haben zahlreiche *In Vitro* Untersuchungen die TGF β -abhängige Modulation intestinaler epithelialer Wundheilungs-vorgänge beschrieben (Barnard et al., 1989; Dignass & Podolsky, 1993 und 1995; Babyatsky et al., 1996).

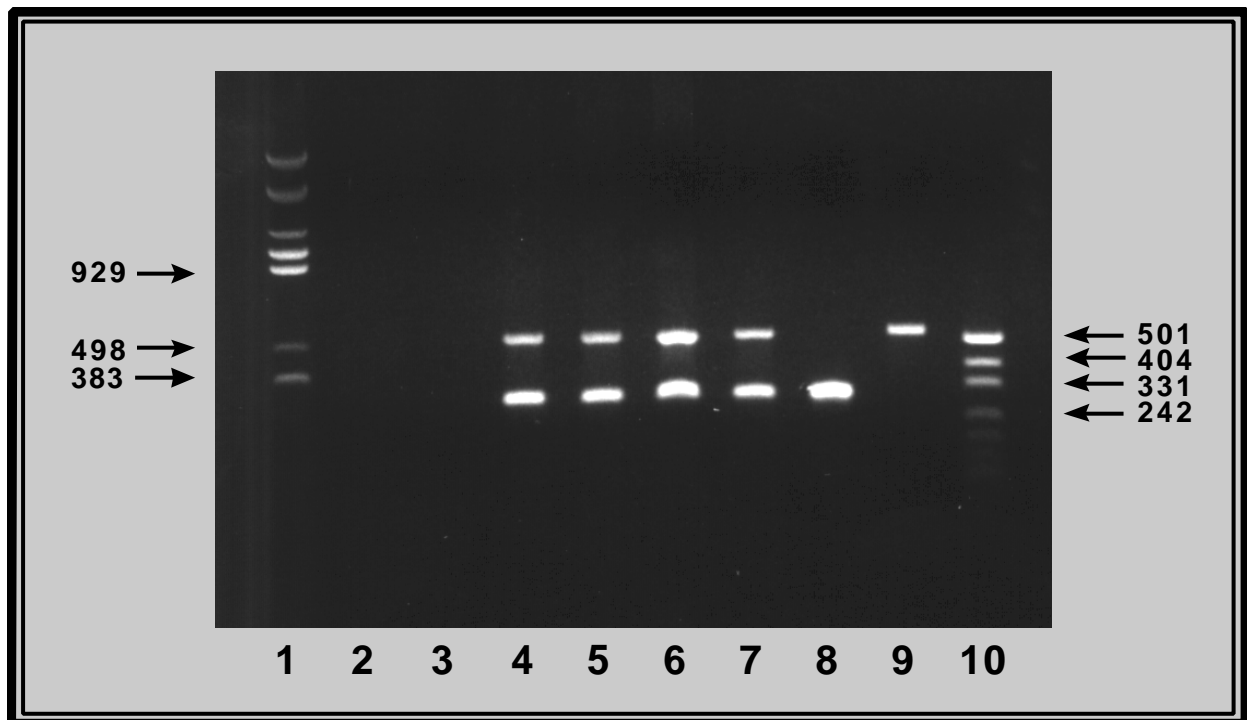


Abbildung 41: Multiplex-PCR-Analyse der mRNA von IEC-6 Zellen nach Wachstum auf extrazellulären Matrixfaktoren nach 24 h

1-2 μ g der aus IEC-6 Zellen gewonnenen mRNA wurden zunächst einer reversen Transkription unterzogen. Die gewonnene cDNA wurde in der anschließenden PCR eingesetzt. Den Proben wurden gleichzeitig Primer für GAPDH, als interner Größenstandard, und TGF β zugegeben. Die Amplifikation umfaßte 25 Reaktionszyklen mit 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min bei 54 °C zur Anlagerung der Primer und 2 min bei 72°C zur Verlängerung der Primer. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 1,2%igen Agarose-Gel in der angegebenen Reihenfolge: **1** - DNA Größenmarker pBR322, Mval und Alw441 geschnitten; **2** - Negativkontrolle ohne RNA; **3** - Negativkontrolle ohne reverse Transkription; **4** - Kontrolle, Wachstum ohne Matrixfaktor; **5** - Kollagen Typ IV; **6** - Fibronectin; **7** - Laminin; **8** - Positivkontrolle für TGF β ; **9** - Positivkontrolle für GAPDH; **10** - DNA-Größenmarker pUC19, MspI geschnitten. Bei den Größenangaben der Marker handelt es sich um Basenpaare.

Zur Überprüfung der These, daß auch die in IEC-6 beschriebenen Änderungen der Migration und Proliferation im Zusammenhang mit Expressionsänderungen des Wachstumsfaktors TGF β

stehen könnten, wurde eine semiquantitative PCR-Analyse der mRNA aus IEC-6 Zellen durchgeführt, die auf verschiedenen Matrixfaktoren gewachsen waren. Als interner Größenmarker wurde im gleichen Ansatz die Expression des konstitutiv exprimierten Gens von GAPDH untersucht. Eine Verwendung von β -Actin erschien als ungeeignet, da eine Veränderung der β -Actin-Expression im Rahmen von Differenzierungsvorgängen in Enterozyten beobachtet werden konnte (Weiser et al., 1990) und nicht auszuschließen ist, daß das Wachstum von IEC-6 Zellen auf extrazellulären Matrixfaktoren zur Induktion dieser führt. Das Ergebnis der PCR-Analyse ist in **Abbildung 41** wiedergegeben. Es zeigte sich, daß die Expression von TGF β auf mRNA-Ebene nicht durch die Anwesenheit der extrazellulären Matrix reguliert wird. Vielmehr war die Expression sowohl bei Wachstum auf einer Plastikmatrix als auch auf Zellkulturplatten, die mit Kollagen Typ IV, Laminin oder Fibronectin beschichtet worden waren, mengenmäßig gleich. Die Ergebnisse belegen, daß in IEC-6 Zellen die Expression von TGF β nicht durch Interaktionen der untersuchten Basalmembrankomponenten mit Integrinen oder anderen Rezeptoren moduliert wird. Dies schließt aber nicht aus, daß es auf einer anderen Ebene der Expression, zum Beispiel im Bereich der Bioaktivierung zu Veränderungen kommt.

3.2.6 Bestimmung von bioaktivem und latentem TGF β in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen nach Wachstum auf extrazellulären Matrixfaktoren

Nachdem anhand der Ergebnisse des vorangegangenen Kapitels ausgeschlossen werden konnte, daß die mRNA Expression von TGF β durch extrazelluläre Matrixfaktoren moduliert wird, stellte sich die Frage, ob Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin eine Veränderung der TGF β -Expression auf einer anderen Ebene bewirken können. Dies wäre denkbar, da TGF β unterschiedlichen Regulationsvorgängen unterworfen ist, zu denen intrazelluläre und extrazelluläre Mechanismen zählen (Sporn & Roberts, 1992). So kann die zelluläre Sekretion ebenso wie die Bioaktivierung des latenten TGF β -Komplexes moduliert werden. Die Mechanismen der Regulation sind bisher nicht aufgeklärt, aber man vermutet die Beteiligung von Proteasen, im besonderen von Plasmin (Flaumenhauf et al., 1992). Die Ermittlung der Peptidkonzentrationen von latentem und bioaktivem TGF β sollte daher darlegen, ob extrazelluläre Matrixfaktoren in der Lage sind, eine TGF β -Expressionänderung auf dieser Ebene zu bewirken. Eine gebräuchliche Methode zur Bestimmung von TGF β ist die von Danielpour et al. (1989) beschriebene Messung unter Verwendung der Nerz-Zelllinie Mv1Lu. Die Anwendung eines Enzymassays ermöglicht aber eine noch genauere Ermittlung der Peptidmengen. So wird die Sensitivität bei Untersuchung von humanen Seren mit 25 pg/ml spezifiziert (Sindern et al., 1996).

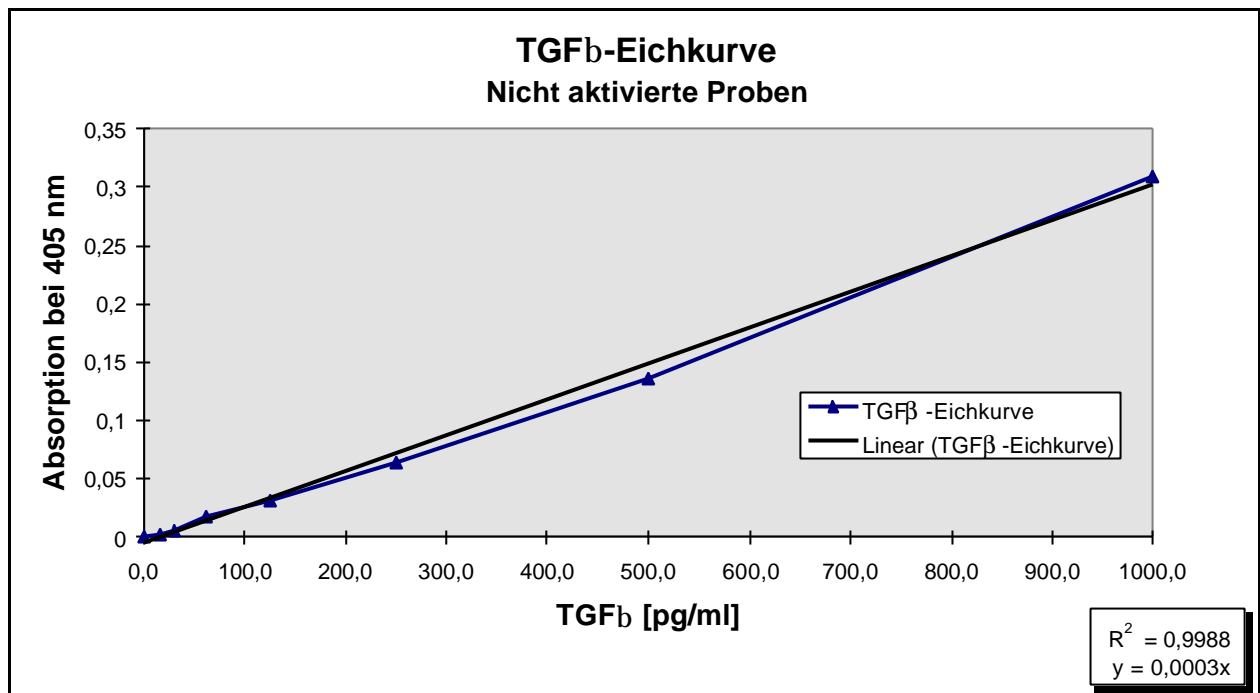


Abbildung 42: Beispielhafte graphische Darstellung einer Eichkurve zur Bestimmung von bioaktivem TGF β in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen. Mit Hilfe der Eichkurve wurde eine Regressionskurve ermittelt, die die Grundlage zur Berechnung der ermittelten Absorptionswerte darstellte. Zur Aufstellung der Eichkurve wurden definierte Konzentrationen eines TGF β -Standards eingesetzt, die genauso wie die zu untersuchenden Proben behandelt wurden. Die Absorptionswerte folgender TGF β -Konzentrationen wurden in Doppelbestimmung ermittelt: 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250; 500; 1000 pg/ml. Die Berechnung der Regressionsgeraden wurde mit dem Windows Programm Excel vorgenommen.

Die Verwendung des ELISAs in den vorliegenden Untersuchungen zur Messung von TGF β in Zellkulturüberständen erbrachte ebenfalls eine hohe Sensitivität. Zudem zeigte sich bei der Regressionsanalyse der Eichkurven, wie beispielhaft in **Abbildung 42** dargestellt, ein hohes Bestimmtheitsmaß für die Messungen. Mit Hilfe des Enzymassay wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, die Menge des bioaktiven TGF β s (nicht aktivierte Proben) und des gesamten TGF β s (aktivierte Proben) bestimmt. Die Ermittlung latenten TGF β -Peptids erfolgte rechnerisch aus den erhobenen Daten. Die Bioaktivierung konnte experimentell durch Ansäuerung der Proben erreicht werden (Danielpour et al., 1989).

In den **Abbildungen 43 bis 45** sind die Ergebnisse der Untersuchungen wiedergegeben. Parallel zu den Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen, die auf verschiedenen Matrices gewachsen waren, wurde das Zellkulturmedium auf Fremd-TGF β aus den zugesetzten Seren untersucht. Es enthielt eine größere Menge an Gesamt-TGF β (500 pg/ml). Um auszuschließen, daß variierende TGF β -Mengen im Serum die Untersuchungsergebnisse verfälschten, wurden stets alle Zellen mit dem gleichen Medium inkubiert und parallel zu jedem Versuch wurde eine Mediumprobe auf den Gehalt an TGF β untersucht. In **Abbildung 37** sind die gemessenen Gesamt-TGF β -Mengen dargestellt. Obwohl sich geringe Schwankungen erkennen lassen, sind die Unterschiede nicht signifikant.

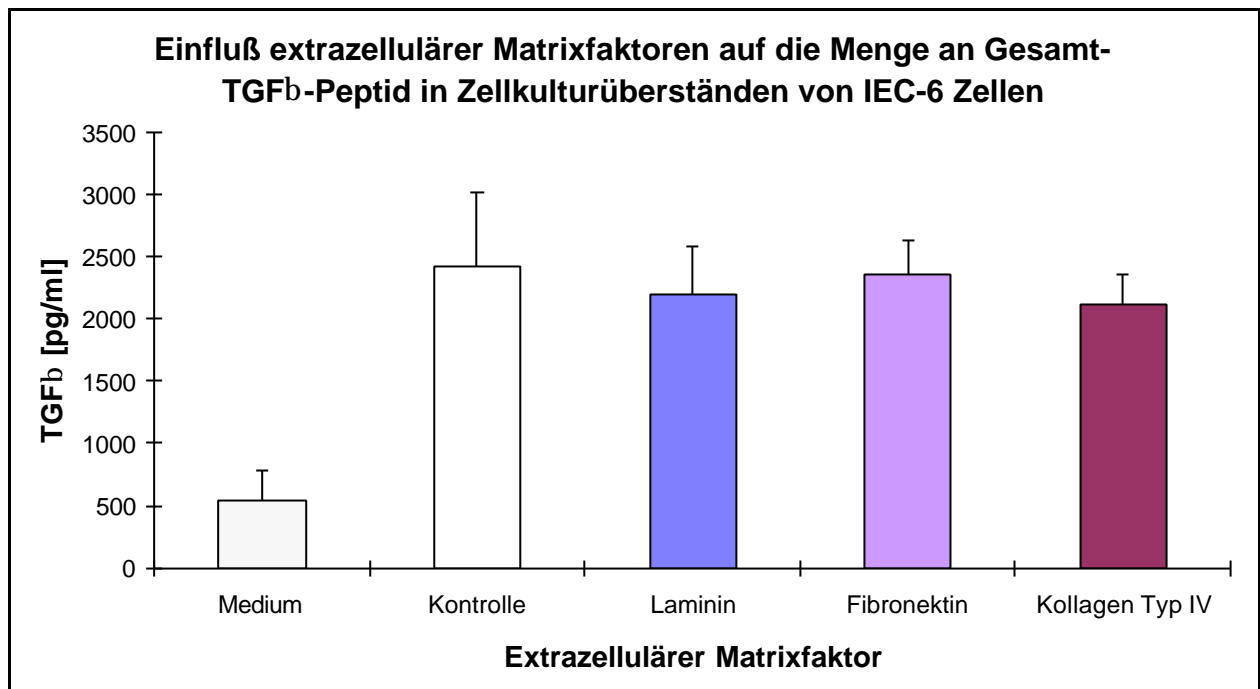


Abbildung 43: Einfluß extrazellulärer Matrixfaktoren auf die Bildung von Gesamt-TGF β -Peptid in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen. IEC-6 Zellen wurden in definierter Anzahl auf unbeschichtete oder mit extrazellulären Matrixfaktoren beschichtete Platten pipettiert und für die Dauer von 24h inkubiert. Parallel wurde das Kulturmedium auf seinen Gehalt an TGF β untersucht. Jeweils 200 μ l Aliquots dieser Überstände wurden zunächst zur Aktivierung des latenten TGF β -Peptids angesäuert und anschließend zur Untersuchung im TGF β -ELISA eingesetzt. Die Ergebnisse stellen die Daten von vier unabhängigen Versuchen mit vier- bis achtfach Bestimmungen dar.

Es kann daher geschlossen werden, daß sich die Gesamtmenge des vorhandenen TGF β s durch das Wachstum der intestinalen Epithelzellen auf extrazellulären Matrixfaktoren nicht ändert. Dies schließt aber nicht aus, daß die beobachteten Effekte von Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin auf die epitheliale Migration und Proliferation auf einen TGF β -abhängigen Mechanismus zurückzuführen sind. Es wäre zum Beispiel möglich, daß die Komponenten der Basalmembran auf Proteasen wirken, die in die Bioaktivierung von TGF β involviert sind. Ob die extrazellulären Matrixfaktoren eine Entlassung von TGF β aus dem latenten TGF β -Komplex bewirken können, kann anhand der Bestimmung latenter und bioaktiver TGF β s in den Zellkulturüberständen untersucht werden.

In **Abbildung 44** und **45** sind die Ergebnisse dieser Bestimmungen wiedergegeben. Das Wachstum der untersuchten IEC-6 Zellen auf Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin führte zu keiner Änderung des Gehalts an bioaktivem TGF β . Da sich die Menge des latenten TGF β s rechnerisch aus Gesamt-TGF β und bioaktivem TGF β ergibt, zeigen diese Werte ebenfalls keine Unterschiede. Eine Bioaktivierung durch die untersuchten Komponenten der Basalmembran kann daher ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die ELISA-Bestimmungen ergeben haben, daß sich die Mengen bioaktiven und latenten TGF β -Peptids bei IEC-6 Zellen durch das Wachstum auf extrazellulären Matrixfaktoren nicht ändern.

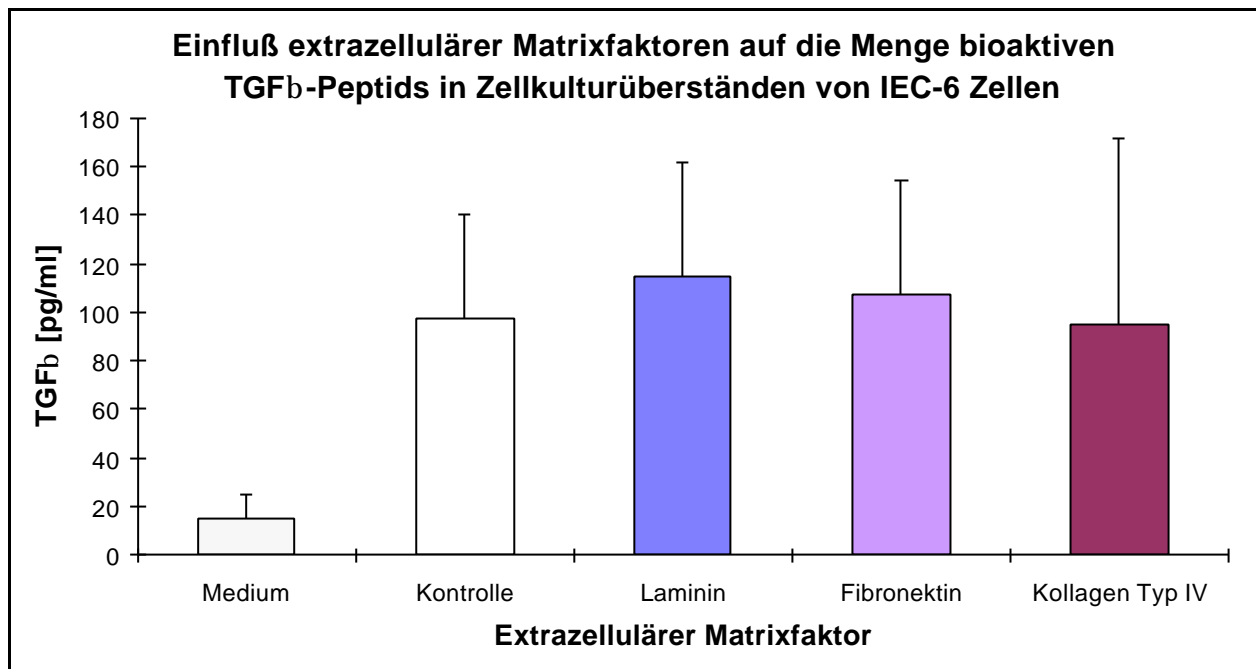


Abbildung 44: Einfluß extrazellulärer Matrixfaktoren auf die Bildung von bioaktiven TGF β -Peptid in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen. IEC-6 Zellen wurden in definierter Anzahl auf unbeschichtete oder mit extrazellulären Matrixfaktoren beschichtete Platten pipettiert und für die Dauer von 24 h inkubiert. Parallel wurde das Kulturmedium auf seinen Gehalt an TGF β untersucht. Jeweils 100 μ l Aliquots dieser Überstände wurden unverdünnt und unbehandelt zur Untersuchung im TGF β -ELISA eingesetzt. Die Ergebnisse stellen die Daten von vier unabhängigen Versuchen mit vier- bis achtfach Bestimmungen dar.

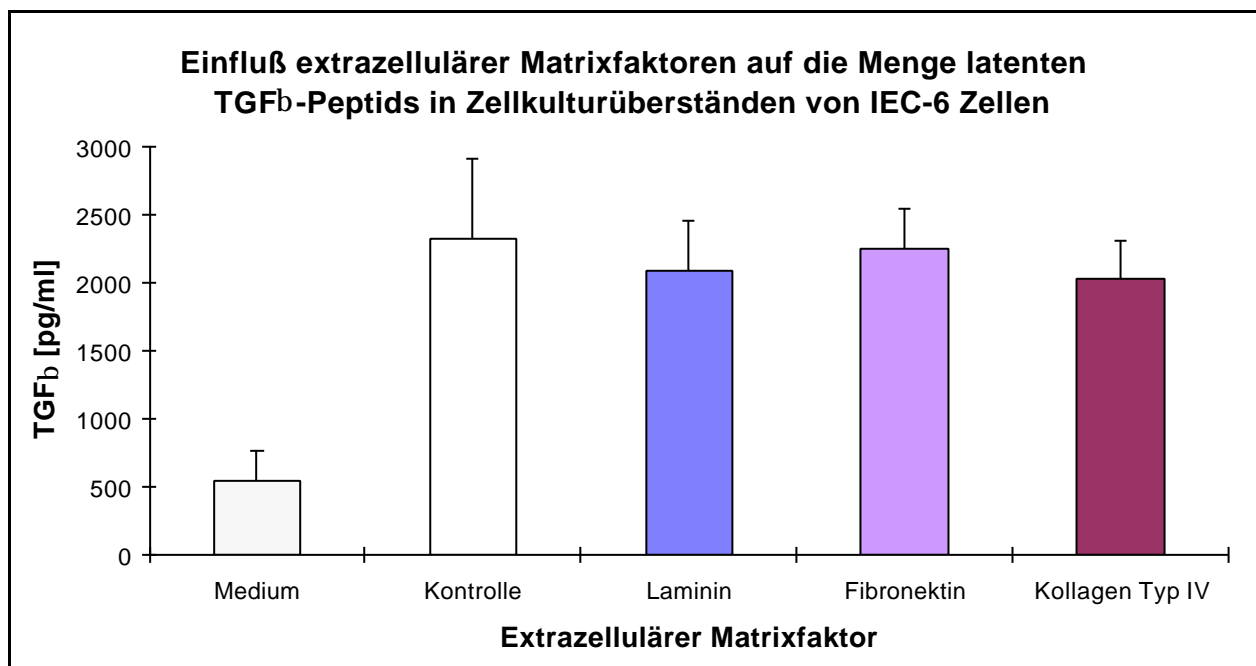


Abbildung 45: Einfluß extrazellulärer Matrixfaktoren auf die Bildung von latentem TGF β -Peptid in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen. IEC-6 Zellen wurden in definierter Anzahl auf unbeschichtete oder mit extrazellulären Matrixfaktoren beschichtete Platten pipettiert und für die Dauer von 24 h inkubiert.

Parallel wurde das Kulturmedium auf seinen Gehalt an TGF β untersucht. Die Ermittlung der latenten TGF β -Peptidmenge erfolgte rechnerisch durch Subtraktion der Menge aktiven TGF β s von der Gesamtmenge an TGF β . Die Ergebnisse stellen die berechneten Daten von vier unabhängigen Versuchen mit vier- bis achtfach Bestimmungen dar.

3.3 Untersuchung zum Einfluß der Adeninnukleotide ADP und ATP auf die Expression von extrazellulären Matrixfaktoren *in vitro*

3.3.1 Northern-Analysen zur Expression extrazellulärer Matrixfaktoren bei IEC-6 Zellen nach Verwundung und/oder Applikation von ADP und ATP

Die Untersuchungen der vorangegangenen Kapitel 3.1 und 3.2 haben schlüssig belegen können, daß Adeninnukleotide in der Lage sind, essentielle physiologische Prozesse der intestinalen epithelialen Wundheilung zu modulieren. Zudem konnte gezeigt werden, daß die Migration von IEC-6 Zellen auf extrazellulären Matrixfaktoren hoch signifikant stimuliert wurde. Adeninnukleotide sind auch in andere zelluläre Vorgänge involviert, die auf eine Beteiligung extrazellulärer Matrixfaktoren schließen lassen. So wird die Adhäsion polymorphnukleärer Granulozyten (PMN) an Endothelzellen durch Applikation von ATP moduliert. Ein Zusammenhang mit der Signalübertragung durch Purinrezeptoren wird in diesem Fall vermutet (Sud´ina et al., 1998).

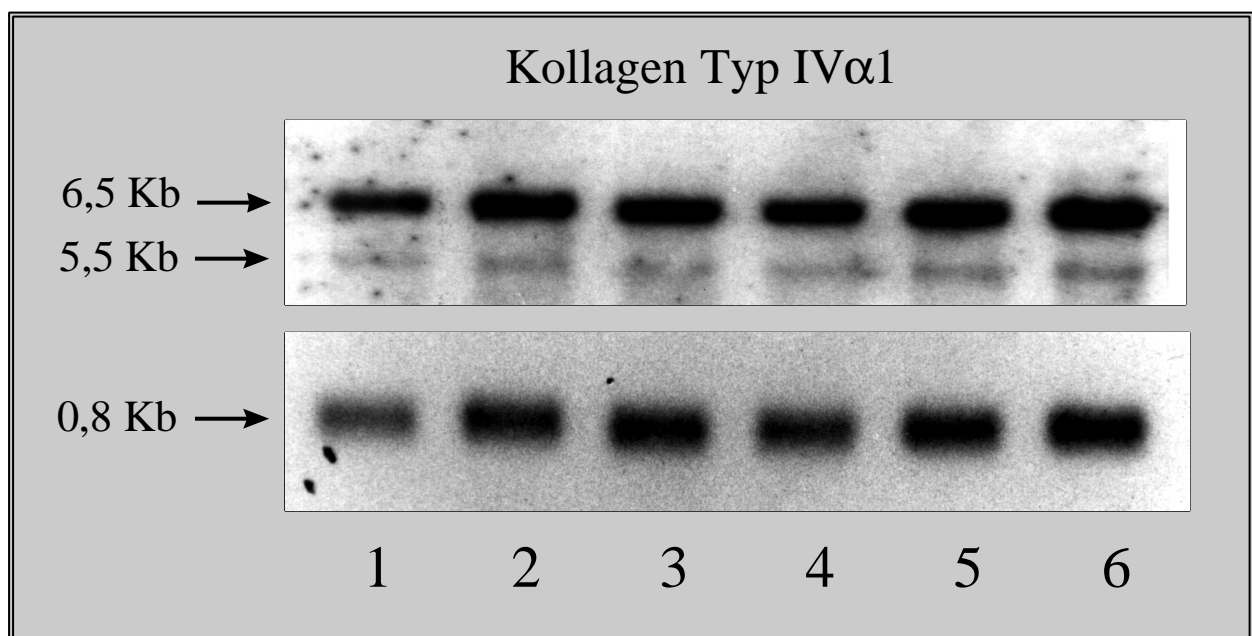


Abbildung 46: Northern Blot-Hybridisierung der mRNA von IEC-6 Zellen nach Behandlung mit ADP und ATP und Verwundung mit einer Kollagen Typ IV-Sonde

IEC-6 Zellen wurden mit 0,1 % Kulturmedium allein oder aber mit Zusatz von 250 μ M ADP oder ATP 6 h inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde gleichzeitig mit der Applikation der Adeninnukleotide verwundet (Wunde) der andere Teil verblieb unverletzt. 3,4 μ g mRNA dieser Zellen wurde in einem Formaldehydgel aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Northern Blots analysiert. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Hybridisierung mit der Kollagen Typ IV-Sonde (19 h bei 42°C). Im unteren Teil der Abbildung ist die Zweithybridisierung des gleichen Blots mit dem internen Größenmarker GAPDH dargestellt (20 h 42°C). Die Waschungen erfolgten wie in Material und Methoden angegeben; die Expositionsdauer für den Kollagen Typ IV Blot betrug 48 h, für GAPDH 1h. Die Proben sind in wie folgt aufgetragen: 1 - Kontrolle; 2 - Kontrolle/Wunde; 3 - 250 μ M ADP; 4 - 250 μ M ADP/Wunde; 5 - 250 μ M ATP; 6 - 250 μ M ATP/Wunde

Da die Aktivierung von P2-Rezeptoren zu einer Inhibition und Stimulation der Genexpression führen kann (Yang & Krauss, 1997), wäre es im Zusammenhang mit den vorliegenden Ergebnissen denkbar, daß Adeninnukleotide über Rezeptor-vermittelte Wege die Expression von

Genen, die für extrazelluläre Matrixfaktoren kodieren, beeinflussen. Eine veränderte Expression von Matrixfaktoren in IEC-6 Zellen ist im Zusammenhang mit Wundheilungsvorgängen und der Applikation von TGF β beobachtet worden (Göke et al., 1998).

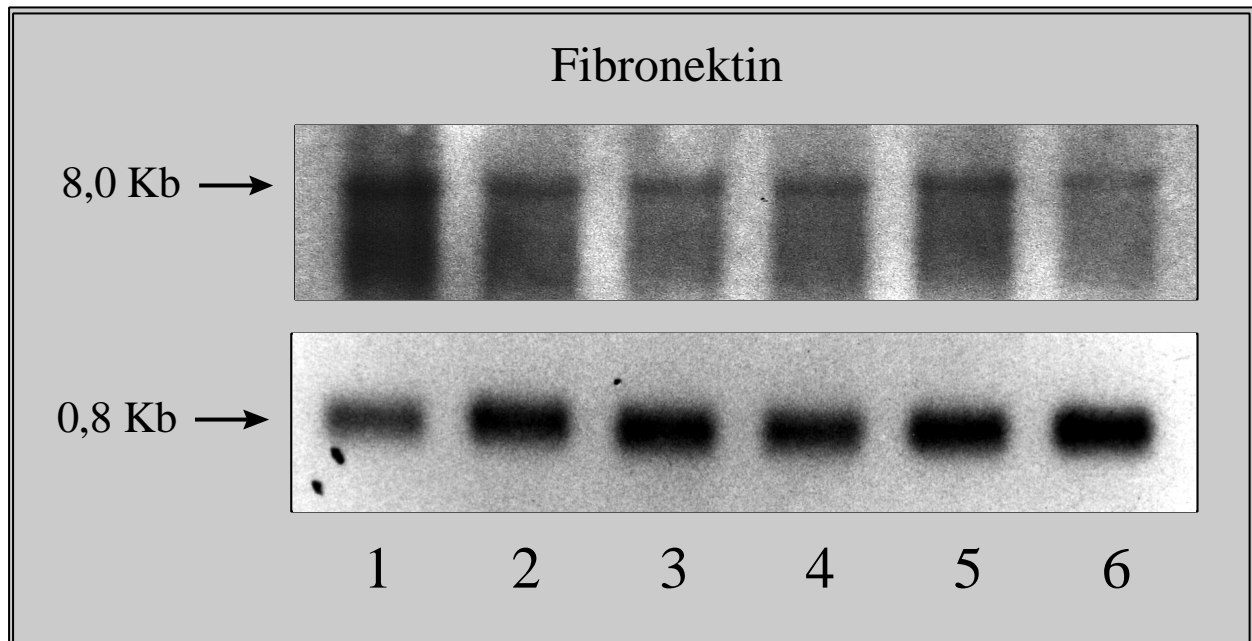


Abbildung 47: Northern Blot-Hybridisierung der mRNA von IEC-6 Zellen nach Behandlung mit ADP und ATP und Verwundung mit einer Fibronectin-Sonde

IEC-6 Zellen wurden mit 0,1 % Kulturmedium allein oder aber mit Zusatz von 250 μ M ADP oder ATP 6 h inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde gleichzeitig mit der Applikation der Adeninnukleotide verwundet (Wunde) der andere Teil verblieb unverletzt. 3,4 μ g mRNA dieser Zellen wurde in einem Formaldehydgel aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Northern Blots analysiert. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Hybridisierung mit der Fibronectin-Sonde (24 h bei 42°C). Im unteren Teil der Abbildung ist die Zweithybridisierung des gleichen Blots mit dem internen Größenmarker GAPDH dargestellt (20 h 42°C). Die Waschungen erfolgten wie in Material und Methoden angegeben; die Expositionsdauer für Fibronectin Blot betrug 72 h, für GAPDH 1h. Auftragung der Proben: 1 - Kontrolle; 2 - Kontrolle/Wunde; 3 - 250 μ M ADP; 4 - 250 μ M ADP/Wunde; 5 - 250 μ M ATP; 6 - 250 μ M ATP/Wunde

Zur Untersuchung der These, daß an der Adeninnukleotid-vermittelte Modulation der intestinalen Migration und Proliferation auch Expressionsänderungen der extrazellulären Matrix beteiligt sein könnten, wurden Northern-Analysen der mRNAs von unverwundeten und verwundeten IEC-6 Zellen, die mit ADP oder ATP behandelt worden waren, vorgenommen. Die Ergebnisse sind in den **Abbildung 46 bis 48** wiedergegeben. Zur Untersuchung der Expression von Kollagen Typ IV wurden die mRNA-Proben mit einer cDNA-Sonde, die gegen die α 1-Kette gerichtet ist, hybridisiert. Es konnten zwei mRNA-Spezies mit Größen von 5,5 Kb und 6,5 Kb aufgefunden werden. Die Detektion dieser Banden ist charakteristisch und konnte von Oberbäumer et al (1985) in der PYS-2 Zelllinie, in EHS-Maustumorzellen und F9 Zellen gezeigt werden. Wie in der **Abbildung 46** zu erkennen, waren keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression festzustellen. Weder die Verletzung der Zellen, noch die Applikation von 250 μ M ADP oder ATP, ohne oder mit Anbringung von Wunden, veränderte die mRNA Mengen signifikant. Die Untersuchung der Expression von Fibronectin erbrachte ähnliche Ergebnisse (**Abbildung 47**). Die Größe der detektierten mRNA betrug 8,0 Kb und deckt sich mit den Beobachtungen von

Göke et al. (1996), die ebenfalls die Expression von Fibronectin in IEC-6 Zellen untersuchten. Auch die mRNA-Parameter für Fibronectin waren nach Adeninnukleotidapplikation und Verletzung unverändert zu den unverletzten und verletzten Kontrollen.

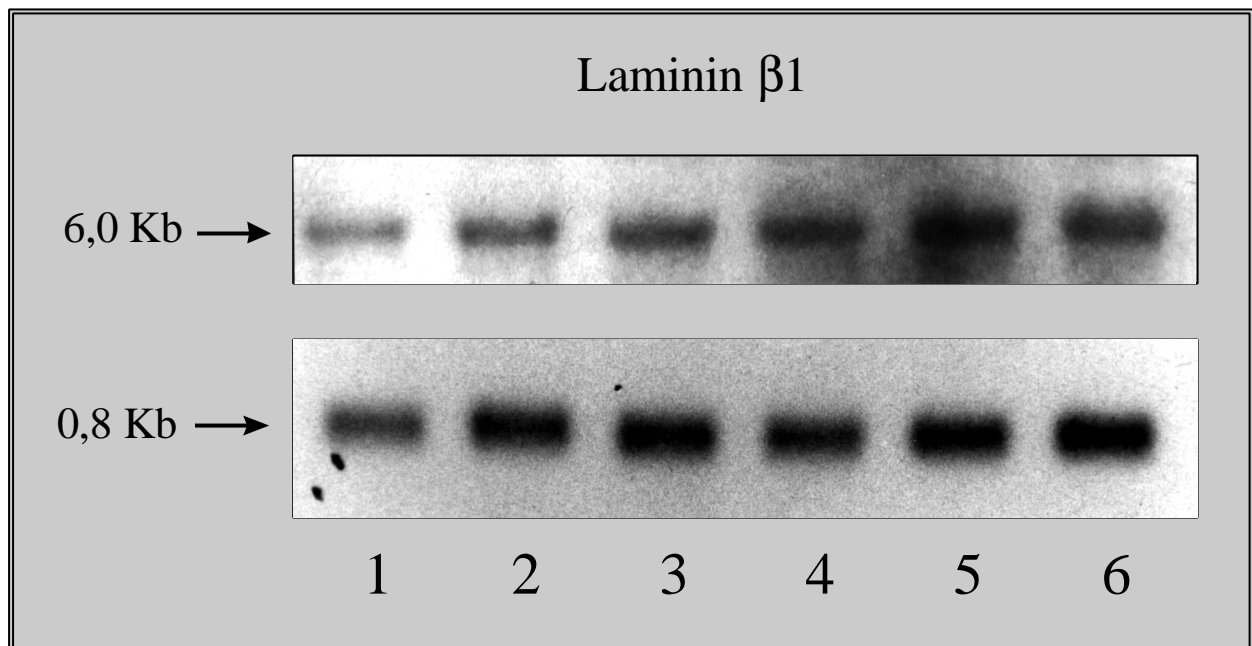


Abbildung 48: Northern Blot-Hybridisierung der mRNA von IEC-6 Zellen nach Behandlung mit ADP und ATP und Verwundung mit einer Laminin β 1-Sonde

IEC-6 Zellen wurden mit 0,1 % Kulturmedium allein oder aber mit Zusatz von 250 μ M ADP oder ATP 6 h inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde gleichzeitig mit der Applikation der Adeninnukleotide verwundet (Wunde) der andere Teil verblieb unverletzt. 3,4 μ g mRNA dieser Zellen wurde in einem Formaldehydgel aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Northern Blots analysiert. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Hybridisierung mit der Laminin β 1-Sonde (21 h bei 42°C). Im unteren Teil der Abbildung ist die Zweithybridisierung des gleichen Blots mit dem internen Größenmarker GAPDH dargestellt (20 h 42°C). Die Waschungen erfolgten wie in Material und Methoden angegeben; die Expositionsdauer für Fibronectin Blot betrug 48 h, für GAPDH 1h. Die Proben sind in folgender Weise aufgetragen: 1 - Kontrolle; 2 - Kontrolle/Wunde; 3 - 250 μ M ADP; 4 - 250 μ M ADP/Wunde; 5 - 250 μ M ATP; 6 - 250 μ M ATP/Wunde

Die dritte Northern-Analyse untersuchte die Expression von Laminin β 1 (**Abbildung 48**), welches zusammen mit Laminin β 2 in intestinalen Zellen koexprimiert wird, während die Expression von Laminin α 1 häufig erst später in der Entwicklung auftritt (Kleinmann et al., 1987). Die Hybridisierung mit der β 1-spezifischen cDNA-Sonde erbrachte ein Signal bei 6,0 Kb, übereinstimmend mit der mRNA Größe von Laminin β 1 in IEC-6 Zellen bei Göke et al. (1996). Obwohl aufgrund des starken Backgrounds die Banden 4 bis 6 stärker erscheinen, ließen sich keine signifikanten Unterschiede verifizieren. Die Laminin β 1-Expression änderte sich nach Gaben von 250 μ M ADP oder ATP ohne oder mit Verwundung nicht.

Zusammenfassend läßt sich daher zu den Northern-Analyse der mRNA verwundeter und nicht verwundeter und mit Adeninnukleotiden behandelten IEC-6 Zellen festhalten, daß die beobachteten Modulation der intestinalen Migration und Proliferation nicht auf eine veränderte Expression extrazellulärer Matrixfaktoren zurückzuführen war.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Adeninnukleotid-vermittelten Modulationen intestinaler epithelialer Wundheilungsvorgänge

Adeninnukleotide sind in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert. Früher hielt man sie für bedeutend aufgrund ihrer Rolle im Energiestoffwechsel, heute weiß man von einer Vielzahl anderer Funktionen zu denen die Beteiligung an der Neurotransmission im peripheren und zentralen Nervensystem, an der Vasodilatation, kardialen Funktionen, der muskulären Kontraktion und Thrombozytenaggregation, Wundheilungsvorgängen und Proliferationsprozessen zählen (Gordon, 1986). Adeninnukleotide vermitteln ihre Wirkungen häufig über Purinrezeptoren, deren Anwesenheit in fast jedem Gewebe und Organ beobachtet werden kann (Dubyak & El Moatassim, 1993). Signifikante Konzentrationen extrazellulären ATPs und ADPs werden im Blut und anderen Körperflüssigkeiten gemessen (Gordon, 1986; Rapaport & Fontaine, 1989). Eine wichtige Quelle extrazellulären ATPs stellt zudem die Freisetzung aus geschädigten oder zugrundegehenden Zellen dar. Relativ hohe Konzentrationen extrazellulären ATPs (500 μ M bis 5 mM) können zum Beispiel in direkter Nachbarschaft zu verletzten Endothelzellen entstehen (Born & Kratzer, 1986). Gleichzeitig wird auch ADP aus den Zellen freigesetzt, und eine weitere Quelle dieses Dinukleotids ergibt sich aus dem Abbau von ATP durch EctoATPasen. Eine erhöhte Freisetzung von ATP konnte im Zusammenhang mit Wundheilungsvorgängen auch in der Nähe Ischämie-geschädigter Nierenepithelzellen beobachtet werden (Gordon, 1986).

Im Zusammenhang mit intestinalen Epithelzellverletzungen sind die Untersuchungen von Feil et al. (1987) von großem Interesse. Diese Arbeitsgruppe beschreibt das Verbleiben einer Schicht nekrotischer Zellen über verletzten intestinalen Epithelzellen *in vivo*. Die beschädigten Zellen sind hierbei in Mukus eingebettet und über Desmosomen mit den unverletzten Epithelzellen verbunden. Sie stellen damit eine Quelle für große Mengen ADP und ATP dar. Diese "nekrotische Kappe" bleibt für mehrere Stunden erhalten, und wird von einigen Autoren als Schutzbarriere interpretiert (Bell et al., 1985). Aus unserer Sicht können Adeninnukleotide, die von diesen geschädigten Zellen freigesetzt werden, die Modulation der Wundheilung durch Stimulation der restlichen Zellen bewirken.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, daß auch Adeninnukleotide in der Lage sind, verschiedene zelluläre Vorgänge, die in die intestinale epitheliale Wundheilung involviert sind, zu modulieren. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Wirkungen einzelner Adeninnukleotide voneinander unterscheiden, und daß die vermittelten Effekte abhängig von der Konzentration der eingesetzten Substanzen sind. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen in anderen Untersuchungssystemen überein. So konnten in Modellen zur Regeneration von Nierentubuli mit Epithelzellen von grünen Meerkatzen wundheilungsfördernde Effekte von Adeninnukleotiden beobachtet werden (Kartha & Toback, 1992a). Auch in Kaninchen bewies der *In vivo* Einsatz von Adeninnukleotiden bei ischämischer Nierenschädigung protektive Funktionen (Sponsel et al., 1995). Ein anderes Modell beschreibt die Verbesserung der Inulin-Clearance als Maßstab für die Regeneration der Nierenfunktion in Ratten nach ATP-Applikation (Paller et al., 1998). Aber nicht nur bei Wundheilungsvorgängen in Nieren, sondern auch im Zusammenhang mit

Reparaturmechanismen, die das zentrale und periphere Nervensystem betreffen, werden Adeninnukleotide als Stimulatoren diskutiert (Neary et al., 1996). Zur Wirkung von Adeninnukleotiden auf die Wundheilung von Zellen des Gastrointestinaltrakts und im besonderen auf Epithelzellen sind nur sehr wenig Informationen verfügbar. So gibt es zum Beispiel Untersuchungen zur Veränderung der Aktivität von Ionenkanälen unter Einfluß von ATP (Kimmich & Randles, 1982). In einer Studie von Moore et al. (1992) findet sich ein indirekter Hinweis auf die Bedeutung der Adeninnukleotide. Der Entzug von ATP aus dem Kulturmedium von isolierten intestinalen Epithelzellen aus Meerschweinchen verzögerte die epitheliale Restitution in einem *In vitro* Wundheilungsmodell signifikant (Moore et al., 1992).

Die detaillierte Aufschlüsselung einzelner Prozesse, die an der Wundheilung intestinaler Epithelzellen beteiligt sind, erbrachte in den vorliegenden Untersuchungen divergente Ergebnisse für die Migration und Proliferation von IEC-6 Zellen. Betrachtet man zunächst die Migration, als initialen Schritt der epithelialen Wundheilung, so zeigte sich, daß sich in den Zellkulturuntersuchungen, daß AMP die Wanderung nicht signifikant verändert, während sowohl ADP als auch ATP die Migration dosisabhängig stimulierten. Im Gegensatz zu diesen Resultaten konnten Kartha und Toback (1992a) eine migrationsfördernde Wirkung sowohl für AMP, ADP und ATP bei Nierenepithelzellen aus Meerkatzen (BSC-1) in einem vergleichbaren Wundheilungsmodell mit verletzten Monolayern beobachten. Auch in diesen Untersuchungen war die Stimulation dosisabhängig. Eine weitere Studie, die die Migration von Nierenepithelzellkulturen (LLC-PK1, MDCK) unter Einfluß von ATP untersucht, zeigte eine 20 (LLC-PK1) bis 60%ige (MDCK) Förderung der *In vitro* Migration (Sponsel et al., 1995).

Im Anschluß an die Migration ist die epitheliale Proliferation an der intestinalen Wundheilung maßgeblich beteiligt. Viele Untersuchungen, die die Wundheilung von Zellen zum Thema haben, beschäftigen sich mit der Proliferation und ihrem positiven Einfluß auf Reparaturvorgänge in verschiedenen Systemen. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen stehen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, die für IEC-6 Zellen eine dosisabhängige Proliferationsinhibition durch ADP und ATP zeigten. Im Zusammenhang mit Wundheilungsvorgängen werden meist proliferationsstimulierende Einflüsse beschrieben. So ist eine Steigerung der Proliferation nach Ischämieschädigung der Rattenniere verantwortlich für die verbesserte Wundheilung (Paller et al., 1998). Bei der Regeneration von Zellen des Nervensystems wird nach ATP-Gaben die Zunahme der Proliferation von Astrozyten aus Hühnern beobachtet. Gleichzeitig kommt es zu einer gesteigerten DNA-Synthese (Rathborne, 1992), die auch für cerebrale, corticale Rattenastrozyten (Neary & Norenberg, 1992) und Primärkulturen von Rattengliazellen beschrieben worden ist (Abbraccio et al., 1994). Zudem werden vor allem im Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren synergistische Aktivierungen der DNA-Synthese in Astrozyten (Neary et al., 1994), Fibroblasten und Keratinozyten (Wang et al., 1990) beobachtet. Neben Hinweisen auf die Proliferationsstimulation und DNA-Syntheseerhöhung, gibt es aber auch eine Vielzahl von Beispielen, in denen Adeninnukleotide die Proliferation signifikant hemmen. Diese Tatsache begründet unter anderem das Interesse an diesen Substanzen im Zusammenhang mit einer möglichen antikarzinogenen Wirkung. Rapaport und Fontaine (1988) konnten zeigen, daß das Wachstum verschiedener Tumorzellen in unterschiedlichen *In vivo* Systemen durch AMP und ATP signifikant inhibiert wird. Auch die Wachstumsinhibition von Mausfibroblasten (3T6) wurde

nach Gabe von exogenem ATP festgestellt (Friedberg & Kübler, 1990). Interessant sind auch die Beobachtungen von Höpfner et al. (1998), die in Kolonkarzinomzellen der Zelllinie HT-29 mit dem ATP-Analogen ATP γ S und UTP einen antiproliferativen Effekt erzielen konnten.

Betrachtet man die migrationsstimulierende und proliferationsinhibierende Wirkung von Adeninnukleotiden auf die Wundheilung von IEC-6 Zellen, so kann man nicht einheitlich von einem positiven oder negativen Effekt sprechen. Es erstaunt daher nicht, daß in *In vivo* Versuchen mit Mäusen die systemische Gabe von ATP nicht zu einer Verbesserung der experimentell erzeugten Colitis führen konnte (Dignass & Karmeli, eigene Untersuchungen). Dennoch muß dieses Ergebnis nicht bedeuten, daß Adeninnukleotide keine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Wundheilungsvorgängen des intestinalen Epithels besitzen, vor allem nicht, wenn man die physiologischen Gegebenheiten betrachtet. Wie zuvor schon dargelegt, verbleibt *in vivo* über dem verletzten Epithel eine Schicht aus geschädigten Zellen, die "nekrotische Kappe", die nach wenigen Stunden abgestoßen wird (Feil et al., 1987). Daraus resultiert eine Freisetzung von ADP und ATP während der frühen Phase der intestinalen Restitution, zu einem Zeitpunkt, an dem die Migration und deren Förderung durch Adeninnukleotide im Mittelpunkt stehen. Erst später sind Proliferationsvorgänge an der Wundheilung beteiligt, vielleicht gerade dann, wenn die geschädigten Zellen sich vom intakten Epithel ablösen, und Adeninnukleotide ihre proliferationsinhibierende Wirkung nicht mehr entfalten können.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zur Migration und Proliferation Adeninnukleotid-behandelter IEC-6 Zellen fällt eine interessante Übereinstimmung mit der Wirkung des Wachstumsfaktor TGF β auf. TGF β besitzt eine zentrale Rolle bei der Modulation intestinaler Wundheilungsvorgänge. So wirkt es auf die intestinale epitheliale Restitution stimulierend (Ciacci et al. 1993) und im Gegensatz dazu auf die Proliferation inhibierend (Kurokawa et al., 1987). Damit ist die Wirkungsweise, bezogen auf diese beiden Parameter, identisch mit der von ADP und ATP. Wir hatten daher postuliert, daß die Adeninnukleotid-vermittelten Wirkungen auf IEC-6 Zellen mit Hilfe eines TGF β -abhängigen Vorgangs reguliert werden. Eine Vielzahl der Wirkungen, die Wachstumsfaktoren in intestinalen Epithelzellen vermitteln, wird über Änderungen der TGF β -Peptide bewirkt (Dignass & Podolsky, 1993; Dignass et al., 1996; Dignass & Podolsky, 1996). So sind zum Beispiel die restitutionsfördernden Effekte von TGF α , EGF, Interleukin-1b, Interleukin-2, IFN γ , aFGF, bFGF und HGF mit Änderungen der TGF β -Mengen *in vitro* verbunden. Zudem konnte für einige Adeninnukleotide gezeigt werden, daß sie die Expression von Wachstumsfaktoren modulieren. So fördern Guanosin und GTP in Astrozyten die Synthese sowohl von Neurotrophinen, wie NGF und Neurotrophin-3, als auch von Zytokinen wie zum Beispiel FGF (Neary et al., 1996). Für ADP konnte die erhöhte Freisetzung eines PDGF-ähnlichen Proteins aus Nierenepithelzellen gezeigt werden (Kantha et al., 1992b). Zur Feststellung, ob auch ADP und ATP in intestinalen Epithelzellen ihre Wirkungen über einen TGF β -abhängigen Mechanismus entfalten, wurde die Proliferation bei gleichzeitiger Zugabe eines TGF β -Antikörpers untersucht, der sich in Versuchen von Ciacci et al. (1993) als wirksam zur Blockierung endogen gebildeten TGF β s erwiesen hatte. Mit Hilfe dieser Experimente konnte eindeutig dargelegt werden, daß Adeninnukleotide mit Hilfe eines anderen Weges die Vermittlung der Migrationsstimulation und Proliferationsinhibition vermitteln.

Bei der Suche nach den Mechanismen mit denen Adeninnukleotide ihre Wirkungen auf Zellen entfalten, stellte sich die generelle Frage nach der Beteiligung von Rezeptor-vermittelten Transduktionswegen. Extrazelluläre Purine und auch Pyrimidine agieren mit Zelloberflächenrezeptoren und regulieren so verschiedene physiologische Prozesse (Williams, 1987; O'Connor et al., 1991; Dubyak & El-Moatassim, 1993). Diese Rezeptoren werden als purinergene Rezeptoren oder auch Purinrezeptoren bezeichnet. Sie wurden zunächst aufgrund ihrer Ansprechbarkeit auf Adenosin oder ATP in P1- und P2-Rezeptoren unterteilt. Die Klassifizierung der P2-Rezeptoren beruhte früher ausschließlich, und auch heute noch zum Teil, auf der pharmakologischen Einordnung mit Hilfe von Agonisten-Stammreihen. Dies ist vor allen Dingen auch deswegen notwendig, da geeignete Antagonisten für viele Fragestellungen fehlen (Suprenant, 1996). Da in den vorliegenden Untersuchungen eine Beteiligung von ADP und ATP an intestinalen epithelialen Wundheilungsvorgängen gezeigt werden konnte, richtete sich das Augenmerk auf die Anwesenheit von P2-Rezeptoren auf IEC-6 Zellen. Die Klasse der P2-Rezeptoren erfährt ebenfalls eine Untergliederung aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften. Eine früher gültige Einteilung in P2x-, P2y-, P2u-, P2t-, P2d- und P2z-Subfamilien (Dalziel & Westfall, 1994; Fredholm et al., 1994) hat im Zuge der Klonierung von Purinrezeptoren ihre Gültigkeit verloren. So unterscheidet man heute lediglich zwei Familien, die P2x- und P2y-Gruppe, in die alle anderen Subtypen eingeordnet werden können (Burnstock, 1996). Erhalten geblieben, und für die vorliegenden Untersuchungen wichtig, ist aber die Ausbildung einiger pharmakologischer Charakteristika, die helfen, eine Unterscheidung beteiligter Rezeptorsubtypen an den Vorgängen bei IEC-6 Zellen vorzunehmen. Alle bisher bekannten Subtypen der P2y-Rezeptorfamilie zeigen in ihrem pharmakologischen Profil eine Wirksamkeit des ATP-Agonisten MeSATP, die über der von ATP oder UTP liegt (Burnstock, 1996). Dagegen ist $\beta\gamma$ Me-ATP am P2x-Subtyp die wirksamste Substanz (Abbraccio & Burnstock, 1994).

Die Charakterisierung der modulatorischen Effekte von Adeninnukleotiden auf die Proliferation der IEC-6 Zellen ergab zunächst, daß sich Suramin antagonistisch im Vergleich zu ADP und ATP verhielt. Suramin ist ein P2-Rezeptorantagonist, der in einigen Untersuchungen P2x-rezeptorspezifisch wirkt. Dies gilt zum Beispiel für Versuche mit Zellen des *Vas deferens* aus Mäusen. Auch in Experimenten an isolierten Arterien aus dem Ohr von Kaninchen hat sich Suramin als P2x-selektiver Antagonist erwiesen (Leff et al., 1990). Obwohl Suramin in diesen und anderen Versuchen als P2x-Rezeptorantagonist wirkt, kann diese Tatsache nicht ohne Reflektion auf IEC-6 Zellen übertragen werden, da es Beispiele gibt, in denen Suramin sowohl am P2x- und P2y-Rezeptorsubtyp antagonistisch wirkt (Burnstock, G., 1990; O'Connor et al., 1991). Die Untersuchungen der Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen mit den schwer hydrolysierbaren ATP-Analoga $\beta\gamma$ Me-ATP und MeSATP erlaubt jedoch nach den oben zitierten Charakteristika eine Unterscheidung der Subtypen. Das ermittelte Agonistenprofil $\beta\gamma$ Me-ATP > ATP \geq ADP > 2MeATP > UTP für die Proliferationshemmung in IEC-6 Zellen definierte den P2-Rezeptor auf IEC-6 Zellen als P2x-Rezeptorsubtyp. Während der Untersuchung einer Beteiligung von P2u- (P2y₂-) Rezeptoren an der intestinalen Proliferationshemmung stellte sich heraus, daß die ADP-, ATP- und $\beta\gamma$ Me-ATP-abhängige Proliferationsinhibition bei gleichzeitiger UTP-Applikation dosisabhängig unterbunden werden konnte. Die Interpretation dieses

Sachverhalts ist schwierig und beinhaltet sicherlich mehrere Möglichkeiten. So wäre die Anwesenheit verschiedener Rezeptoren denkbar, die gegensätzliche Signale auslösen. Vergleichbares findet man zum Beispiel für glatte Muskelzellen der Kaninchenpfortader, deren P2y₂-Rezeptoren eine Vasodilatation vermitteln, während die parallel exprimierten P2x-Rezeptoren verantwortlich für vasokonstruktive Ereignisse sind (Kennedy & Burnstock, 1985). Da die alleinige Applikation von UTP in IEC-6 Zellen gar keine Wirkung zeigt, erscheint diese Möglichkeit ausgeschlossen. Eine zweite Möglichkeit wäre die Kopplung zweier Rezeptoren an die gleiche Signalkaskade, wobei die Besetzung des einen Rezeptors keine Wirkung hat, aber dennoch die Weiterleitung des anderen Rezeptors blockieren kann. Die Kopplung zweier Rezeptoren an das gleiche Signalübertragungsmolekül konnte für Aortenendothelzellen aus Rindern belegt werden. Sowohl P2y₁- als auch P2y₂-Rezeptoren sind über verschiedene G-Proteine an die Phospholipase C gekoppelt (O'Connor et al., 1991; Boeynaems et al., 1996). Der Sinn der Verknüpfung der Übertragungswege beider Rezeptoren ist aber bisher nicht geklärt. Die dritte Sichtweise der Ergebnisse beinhaltet die Blockierung der Rezeptorbindungsstelle durch UTP. Vergleichbare Hinweise sind in der Literatur nicht vorhanden. Die Tatsache, daß mit steigenden Konzentrationen linear die ADP, ATP und $\beta\gamma$ Me-ATP vermittelte Antwort abnimmt, könnte eine Verdrängungskompetition der aktiven durch die inaktiven Liganden beinhalten. Dies würde bedeuten, daß UTP eine größere Affinität zu dem P2-Rezeptor besitzt, der die Proliferationsinhibition in IEC-6 Zellen vermittelt, aber nicht in der Lage ist eine Antwort zu generieren.

Prinzipiell birgt die Charakterisierung und Klassifizierung von Rezeptoren mit Hilfe von pharmakologischen Profilen einige Schwierigkeiten. Erschwerend ist zum Beispiel die Tatsache, daß auf einem Zelltyp verschiedene Purinrezeptorsubtypen vorkommen können. Dies hat man unter anderem auch für Endothelzellen aus Rattenhirnen zeigen können, die über P2y-(P2y₁-) und P2u- (P2y₂-) Rezeptoren verfügen, die zudem auch noch gegensätzliche Wirkungen vermitteln. So sind die Beobachtungen eine Summe der Wirkungen beider Rezeptoren (Barnard et al., 1996). Problematisch ist außerdem, daß Rezeptoren einer Subfamilie in verschiedenen Geweben oder auf unterschiedlichen Zellen divergente Agonistenprofile besitzen können. Dies gilt zum Beispiel für P2x₄-Rezeptoren aus neuronalen Rattenzellen (Soto et al., 1996) und Zellen des Rückenmarks der Ratte (Buell et al., 1996). Nach neueren Erkenntnissen ist auch die Bildung von Heteropolymeren zum Beispiel aus P2x₂- und P2x₃- Rezeptor-Anteilen möglich (Lewis et al., 1995). Obwohl die Charakterisierung von Purinrezeptorsubtypen mit Agonisten-Stammreihen einige Schwierigkeiten beinhaltet, stellt sie zunächst eine gute Möglichkeit dar, die Anwesenheit von Rezeptoren für Adeninnukleotide nachzuweisen, und gewährleistet zudem eine grobe Einordnung der beteiligten Subtypen. Dies ist besonders wichtig, da die bisher bekannten Untersuchungen sehr unterschiedliche Sequenzen für die einzelnen Rezeptoren ergeben haben, und es eine große Vielzahl verschiedener Subtypen gibt. So erlaubt die pharmakologische Charakterisierung die vorläufige Einordnung der gesuchten Rezeptoren und ermöglicht eine gezielte Suche mit Hilfe molekularbiologischer Methoden.

Nach Zuordnung der Proliferationsinhibition zu einem P2x-Rezeptorssubtyp, stellte sich die Frage nach der Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur Migrationsstimulation. Sofern beide zellulären Ereignisse in den untersuchten IEC-6 Zellen über den gleichen Rezeptortyp vermittelt

würden, sollte der wirksamste Agonist der Proliferationsinhibition auch die intestinale epitheliale Migration am stärksten beeinflussen. Die Untersuchung zur Restitutionsfähigkeit von IEC-6 Zellen im *In vitro* Wundheilungsmodell mit verschiedenen Konzentrationen $\beta\gamma$ Me-ATP zeigte aber, daß dieses ATP-Analogon zwar eine tendenziell stimulierende, aber nicht signifikante Wirkung auf die Migration der intestinalen Epithelzellen hatte, die zudem deutlich unter der bei ADP und ATP beobachteten lag. Diese Ergebnisse erlauben den Schluß, daß die Adeninnukleotid-vermittelten Einflüsse auf die IEC-6 Zellmigration und -proliferation über unterschiedliche Rezeptorsubtypen ausgeübt werden. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit einer Vielzahl von Untersuchungen, die die Unabhängigkeit dieser physiologischen Prozessen bestätigt. Besonders auffällig ist dies bei der Regeneration der Magenmukosa, die schon drei Minuten nach der Verletzung beginnt und innerhalb von wenigen Stunden abgeschlossen ist. (Davenport et al., 1964; Silen et al., 1987; Lacy et al., 1988). Aber nicht nur im Magen schließt die enorm schnelle Regeneration eine Beteiligung der Proliferation während der frühen Wundheilungsphase aus. In Versuchen von Nusrat et al. (1992) mit T84-Zellen (Kolonkarzinomzellen), die eine Verdopplungszeit von 7 Tagen besitzen, ist der Verschluß der experimentellen Wunddefekte nach 20 Stunden abgeschlossen. Auch für die Dünndarmmukosa aus Ratten konnten Moore et al. (1989) zeigen, daß die Migration unabhängig von der Zellproliferation ist, denn die Reepithelialisierung war innerhalb einer Zeitspanne abgeschlossen, die den Zellen nicht ausgereicht hätte, in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten. Die partielle Proliferationshemmung durch Serum- und Isoleucinentzug in IEC-6 Zellen (McCormack et al., 1992) oder die vollständige Inhibition durch Mitomycin C (Basson et al., 1992a; Dignass, 1997), wie sie experimentell auch in den vorliegenden Versuchen vorgenommen wurde, belegt schlüssig, daß die intestinale epitheliale Migration und Proliferation zwei unabhängige Vorgänge darstellen. Es verwundert daher nicht, daß Adeninnukleotide diese Prozesse in unterschiedlicher Art und Weise regulieren.

Zur Frage der Regulation Adeninnukleotid-vermittelter Prozesse und der Purinrezeptoraktivierung sind eine Vielzahl möglicher Signaltransduktionswege beschrieben. Sie beinhalten die Vermittlung mitogener oder differenzierender Signale über eine Erhöhung des Kalzium-Einstroms, sowie die Mobilisierung von Inositphospholipiden und Inositphosphaten, aber auch die Arachidonsäurebildung und Prostaglandin-Freisetzung (Neary et al., 1994). Desweiteren sind die Regulation der Adenylatcyclase, die Aktivierung der Proteinkinase C und der Phospholipase C beobachtet worden (Anderson et al., 1991; Harada et al., 1993). In engem Zusammenhang mit der Wirkung von Substanzen auf Migrations- und Proliferationsvorgänge, wie sie für IEC-6 Zellen in dieser Arbeit beschrieben wurden, steht häufig die Aktivierung von MAP-Kinasen. Es handelt sich bei ihnen um cytoplasmatische Proteinkinasen, die Schlüsselemente der intrazellulären Signalübertragung darstellen. Aufgrund ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre Liganden werden sie häufig als extrazellulär regulierte Kinasen (ERK) bezeichnet, so daß der Begriff MAP-Kinase und ERK parallel verwendet wird. Eine Aktivierung von MAP-Kinase-abhängigen Signalkaskaden nach Adeninnukleotidapplikation konnte in verschiedenen Untersuchungen sowohl direkt als auch indirekt durch den Nachweis beteiligter Signalmoleküle nachgewiesen werden. Die gesteigerte Expression von Protoonkogenen (c-myc und c-ras), die ein Resultat der Aktivierung von MAP-Kinasen sein kann, konnte in Nierenepithelzellen nach ADP-Applikation beobachtet werden. Gleichzeitig wurde in diesen Untersuchungen auch eine Erhöhung des

Transferrinrezeptor-Transkripts nach ADP-Applikation festgestellt (Kartha et al., 1987). Auch die Untersuchung der mitogenen Wirkung von ATP auf Rattenastrozyten ist mit einer Aktivierung von MAP-Kinasen verbunden (Neary, 1996).

Auch in den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Aktivierung der MAP-Kinase nach ADP, ATP und $\beta\gamma$ Me-ATP-Applikation gezeigt werden. In mehreren Einzelexperimenten wurde eine, wenn auch im Ausmaß unterschiedliche, Phosphorylierung des experimentellen Substrats der MAP-Kinase, des Myelinbasisproteins (MBP) beobachtet. Die angewandte Meßmethode erlaubt keine Aussage über die Höhe der Aktivierung und damit auch keine Unterscheidung der Stärke des Signals für einzelne Adeninnukleotide. Die Tatsache, daß es zu einer MAP-Kinase-Aktivierung kommt, ist besonders interessant, da im Zusammenhang mit der Übertragung von Wundsignalen eine Beteiligung dieser Elemente der Signalkaskaden diskutiert wird. Hierbei reichen die Beobachtungen bis ins Pflanzenreich, wo eine ERK-verwandte Tabak-MAP-Kinase nach mechanischer Blattverletzung aktiviert wird (Seo et al., 1995). Die Induktion von c-fos als Antwort auf Verletzungen ist in einer Vielzahl von Geweben beschrieben worden (Dieckgraefe et al., 1997). In Caco-2 Zellen werden während der frühen Phase der Restitution in Abhängigkeit von Migrationsvorgängen Rho-Proteine benötigt (Santos et al., 1997a). Rho-Proteine können MAP-Kinase-Signalkaskaden aktivieren. Interessant sind auch Untersuchungen von Paller et al. (1998), da sie eine Verknüpfung zwischen den Signalen, die während der Wundheilung generiert werden und solchen, die nach ATP-Applikation entstehen, aufzeigen. Diese Arbeitsgruppe konnte belegen, daß es zu einer Erhöhung von c-fos sowohl in Ischämie-geschädigten Nierenepithelzellen als auch nach Applikation von ATP kommt. Der beteiligte Purinrezeptor soll in diesem Fall der P2x-Familie angehören. In diesem Modell existiert eine Übereinstimmung der Signale, die nach Verletzung und ATP-Applikation in die Informationsvermittlung involviert sind. Diese Feststellung erlangt besondere Bedeutung in Kontext zu neueren Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen, die die Beteiligung von ERK und p38-Kinasen (Dieckgraefe et al., 1997) und ERK1, ERK2, sowie JNK1-MAPKs (Göke et al., 1998) an Wundheilungsvorgängen bei IEC-6 Zellen demonstriert haben. Es wäre also denkbar, daß Adeninnukleotide, ihre Effekte auf IEC-6 Zellen entfalten, indem sie sich der gleichen Signalkaskaden bedienen, die auch bei der intestinalen epithelialen Restitution eine entscheidende Rolle spielen. Eine weitere Unterstützung erfährt diese These auch durch den Bericht über die Beteiligung des Transkriptionsfaktors Elk-1 bei der Expressionserhöhung von TGF β , der nach ERK-Aktivierung zusammen mit einem "serum response factor" an bestimmte Bereiche der DNA bindet und gezielt die Transkription bestimmter Gene erhöht (Dey et al., 1994). TGF β spielt, wie schon zuvor dargelegt eine wesentliche Rolle bei der intestinalen Wundheilung in IEC-6 Zellen.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Signaltransduktion im Zusammenhang mit der P2-Rezeptorvermittlung ist die Diskussion apoptotischer Vorgänge, die nach P2-Aktivierung im allgemeinen beobachtet werden, aber im besonderen die P2x-Rezeptoren betreffen. Der P2y₃-Rezeptor wirkt letal bei Transfektion in verschiedene Zelllinien (Barnard et al., 1996). Der P2z- (P2y₄-) Rezeptor stimuliert nach Bindung von ATP das Interleukin-1b converting enzyme (ICE): ICE ist eine Protease, die bei Apoptosevorgängen in Epithelzellen, die ohne extrazelluläre Matrix wachsen, aktiviert wird (Boudreau et al., 1995). Besonders überraschend in diesem Zusammenhang aber waren die Klonierungsuntersuchungen der P2x-Rezeptoren. Denn

zwischen diesen ionophoren Rezeptoren und dem Zelltod gibt es einen engen Zusammenhang. Es existiert eine Sequenzhomologie zwischen den P2x-Rezeptoren, die aus PC-12 Zellen und glatten Muskelzellen der Ratte kloniert wurden (Valera et al., 1994; Brake et al., 1994) und dem RP-2 Protein, welches in apoptotischen T-Zellen gebildet wird. Die Applikation von ATP konnte zum Beispiel in P2x₄-exprimierenden Thymozyten und Hepatozyten als Verursacher des Zelltods identifiziert werden (Zheng et al., 1996). Auch ATPvermittelte Cytotoxizität ist in Form einer Zell-Lyse in Lymphom-Zellen (EL-4) beobachtet worden (Avery et al., 1992). Die Vitalitätsuntersuchungen an IEC-6 Zellen nach der Applikation von ADP, ATP und $\beta\gamma$ Me-ATP sollten die Möglichkeit untersuchen, ob diese Adeninnukleotide eine cytotoxische oder apoptotische Wirkung auf IEC-6 Zellen ausüben. Die Trypanblau-Vitalitätsfärbung ergab für keine der untersuchten Substanzen eine Veränderung des Anteils letaler Zellen. Auch morphologische Auffälligkeiten ließen sich bei der Betrachtung im Mikroskop nicht feststellen. Um apoptotische Vorgänge zu erfassen wurde die DNA Adeninnukleotid-behandelter IEC-6 Zellen untersucht. Die DNA-Degradation in ungefähr 200 Bp große Fragmente, wie man sie zum Beispiel auch in Thymozyten nach der Behandlung mit Glucocorticoiden findet, gilt als deutlicher Marker des programmierten Zelltods (Wyllie et al., 1980). Auch in IEC-6 Zellen, die sich von ihrer Unterfläche gelöst und ihre Adhäsionsfähigkeit verloren hatten, stellte man eine Chromatinkondensation und DNA-Degradation in circa 180 Bp große Fragmenten fest (Ametani et al., 1996). Die Ergebnisse der DNA-Analysen zeigten, keinerlei Anzeichen einer DNA-Fragmentierung, so daß apoptotische Vorgänge ausgeschlossen werden können. Da aber vor allem bei ATP-vermittelter Cytotoxizität die DNA-Fragmentierung nicht immer zwingend gegeben ist, wurden zusätzlich Experimente durchgeführt, die belegen sollten, daß die Adeninnukleotid-vermittelten Wirkungen reversibel sind. Nach Entfernen von ADP, ATP und $\beta\gamma$ Me-ATP zeigten alle Zellen eine normale Proliferation. Anhand dieser Untersuchungen kann ausgeschlossen werden, daß Adeninnukleotide auf IEC-6 Zellen eine apoptotische oder nekrotische Wirkung ausüben. Wie die Proliferation unterbunden wird, ist unklar; eventuell sind auch Regulationsmechanismen des Zellzyklus beteiligt. Die Kontrolle des Zellzyklus in IEC-6 Zellen ist noch nicht umfassend untersucht. Man beobachtet aber eine Wachstumsarretierung während der Migration der IEC-6 Zellen entlang der Krypten-Villus Achse (Beaulieu, 1992; Beauchamp et al., 1996) und auch in Zellkulturen 3 Tage nach Erreichen der Konfluenz, wahrscheinlich durch eine Kontaktinhibition. Es soll nach Untersuchungen von Suh et al. (1996) ein Darm-spezifisches Homöobox-Gen, das CDx2 beteiligt sein, welches als Transkriptionsfaktor für die Aktivierung einer Vielzahl von Genen verantwortlich ist. Die zukünftige Aufklärung der Regulationsvorgänge des Zellzyklus in IEC-6 Zellen ist sicher auch förderlich für das Verständnis der intestinalen epithelialen Wundheilung.

4.2 Analyse der Wirkungen extrazellulärer Matrixfaktoren auf intestinale epitheliale Wundheilungsvorgänge

Die Diskussion der Ergebnisse in Kapitel 4.1 haben darlegen können, daß neben den bereits bekannten Faktoren wie Zytokinen und Hormonen weitere lösliche extrazelluläre Substanzen, die Adeninnukleotide in der Lage sind, epitheliale Wundheilungsvorgänge zu modulieren. Aber nicht nur gelöste Substanzen des extrazellulären Raumes oder des Blutstroms, sondern auch

Bestandteile der extrazellulären Matrix sind an der Regulation physiologischer Prozesse des intestinalen Epithels beteiligt. Epitheliale Zellen stehen mit ihrer Umgebung in direktem Kontakt und sowohl Zell-Zell-Interaktionen als auch Zell-Matrix Wechselwirkungen sind am Informationsaustausch beteiligt. Die extrazelluläre Matrix hat damit nicht nur eine Bedeutung für die Gewebsarchitektur, sondern sie ist auch aktiver Teilnehmer an Signalübertragungsprozessen. Ihre Komponenten beeinflussen die Zelladhäsion, Morphologie, Motilität und Reifung von Zellen. Die extrazelluläre Matrix ist bei Epithelzellen in Form einer Basalmembran ausgebildet und stellt eine spezialisierte Form dar, die der Gewebsabgrenzung zwischen mesenchymalem und epithelialelem Gewebe dient (Vracko, 1974). Die Interaktionen zwischen intestinalen epithelialen Zellen und den darunterliegenden Basalmembrankomponenten sind nicht vollständig aufgeklärt. Dennoch ist bekannt, daß die intestinale Adhäsion, Morphogenese und Differenzierung von ihnen beeinflußt wird (Carrol et al., 1988; Olson et al., 1991; Moore et al., 1994). Mit Hilfe von Immunfluoreszenzuntersuchungen und der Immunelektronenmikroskopie konnten die strukturellen Hauptkomponenten der intestinalen Basalmembran identifiziert werden. Es sind Kollagen Typ IV, die nicht-kollagenösen Glycoproteine Laminin und Fibronectin, Nidogen und ein Heparansulfatproteoglycan (Laurie et al., 1982; Hahn et al., 1990). Vielfach werden die Wirkungen von Basalmembrankomponenten mit einem Membranextrakt aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-(EHS)-Tumor untersucht. Dies bietet zwar den Vorteil das Verhalten von Zellen auf einer Basalmembran-ähnlichen Matrix zu untersuchen, erlaubt aber nicht die Betrachtung der Effekte einzelner extrazellulärer Matrixkomponenten. Die vorliegenden Untersuchungen hatten daher zum Ziel, die Wirkung von Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin getrennt voneinander zu untersuchen und zwar unter Berücksichtigung der intestinalen epithelialen Adhäsion, Migration und Proliferation.

Der Adhäsion muß in diesem Zusammenhang aus mehreren Gründen Aufmerksamkeit gewährt werden. Allgemein betrachtet ist die Struktur und Funktion der Zellverbände höherer Organismen abhängig von adhäsiven Interaktionen. Die Anheftung der Zellen an die extrazelluläre Matrix hat einen regulierenden Einfluß auf das Wanderungsverhalten der einzelnen Zellen eines Zellverbandes. Die Adhäsionsprozesse dienen nicht nur dem bloßen Zusammenhalt der Zellen, sondern sie haben auch einen Einfluß auf zentrale physiologische Funktionen einer Zelle (Krauss, 1997). Das intestinale Epithel ist gekennzeichnet durch eine sich stetig erneuernde Epithelzellschicht. Im Rahmen dieser Erneuerung und im Zusammenhang mit der Regeneration des Epithels nach oberflächlichen Mukosaverletzungen, kommt es zu einer Wanderung sich differenzierender Epithelzellen aus dem Bereich der Krypten heraus in Richtung ihres Bestimmungsortes, den Villusspitzen (Beaulieu, 1992). Die adhäsive Interaktion, das heißt das gezielte Knüpfen und Lösen von Bindungen an die darunterliegende extrazelluläre Matrix spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Moore et al., 1994; Clark & Brugge, 1995). Zudem stellen Adhäsionsvorgänge einen entscheidenden initialen Schritt bei der Migration von Zellen dar (Ruoslahti, 1991), die wiederum essentiell ist für die physiologische und reparaturbedingte Reepithelialisierung der Villusregionen.

Um die Adhäsion von IEC-6 Zellen an extrazelluläre Matrixfaktoren zu charakterisieren, stand zunächst die Suche nach einem geeigneten Adhäsionsassay im Mittelpunkt. Das ubiquitär vorkommende Enzym Hexosaminidase konnte in den intestinalen Epithelzellen nachgewiesen

werden, und die Erhebung einer Kinetik ermittelte günstige Untersuchungszeiträume und Zellzahlen. Das Erstellen einer aussagekräftigen Kinetik ist unbedingt notwendig, wenn ein Assay zum ersten Mal mit einer neuen Zelllinie ausgetestet wird. Die Sensitivität des Hexosaminidase-Adhäsionsassays wird von Santoro et al. (1994), der mit dieser Methode die Adhäsion von Thymozyten an Kollagen untersucht, gleichgesetzt mit der Genauigkeit der radioaktiven ^{51}Cr -Messung. Auch die Anwendung bei IEC-6 Zellen zeigte eine hohe Linearität zwischen eingesetzter Zellzahl und Farbentwicklung. Die Untersuchung der Adhäsion von IEC-6 Zellen an die Basalmembran Komponenten zeigte für alle Faktoren eine deutliche Steigerung der Adhäsionsfähigkeit. Damit konnten die Experimente belegen, daß intestinale epitheliale Zellen über Rezeptoren für Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin verfügen, denn alle unspezifischen Bindungsstellen waren durch vorherige Behandlung mit BSA blockiert worden. Auch Carroll et al. (1988) haben gefunden, daß IEC-6 Zellen in der Lage sind, an Basalmembranextrakte zu binden, allerdings wurden die einzelnen Komponenten nicht näher in den Untersuchungen spezifiziert. Auch für Enterozyten (Hahn et al. 1987) und foetale Epithelzellen des Rattendünndarms (Hahn et al., 1990) konnte eine Adhäsion an Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin gezeigt werden, die deutlich über der der Kontrolle lag. Betrachtet man die vorliegenden Daten mit intestinalen IEC-6 Zellen, so ist eine eindeutige Rangfolge bezüglich der Anheftung zu erkennen. Kollagen Typ IV förderte die Zelladhäsion hoch signifikant gegenüber Laminin und Fibronectin. Alle drei Matrixfaktoren stimulierten die Anheftung der intestinalen Zellen gegenüber der Plastikkontrolle hoch signifikant. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen von Moore et al. (1994) für Enterozyten und kolorektale Karzinomzellen (Schreiner et al., 1991) und Caco-2 Zellen (Basson et al., 1992), die eine Präferenz für Kollagen Typ IV zeigen. Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen foetaler intestinaler Epithelzellen nach der Isolation andere Resultate, denn sie adhärieren am besten an Fibronectin (Hahn et al., 1990). Für humane Kolonozyten konnte eine fehlende Anheftung an Laminin dargestellt werden (Ishii et al., 1994). Eine exakte Übereinstimmung mit den erhobenen Daten bezüglich einer Rangfolge der Anheftung konnte in den Untersuchungen von Basson et al. (1992) mit Caco-2 Zellen beobachtet werden. Sowohl Kollagen Typ IV, als auch Fibronectin und Laminin förderten die Adhäsion, doch Kollagen zeigte die höchsten Werte. Die außergewöhnliche Bedeutung von Kollagen Typ IV wird unter anderem auch in Versuchen mit Anti-Kollagen Typ IV-Antikörpern deutlich. Die beeinträchtigte Adhäsion bewirkt eine deutliche Verschlechterung der epithelialen Restitution in Meerschweinchen (Moore et al., 1992). Auch der Einsatz von Antikörpern, die gegen die nicht-kollagenöse NC1-Domäne von Kollagen Typ IV gerichtet sind, unterband die Migration von IEC-6 Zellen (Göke et al., 1996). Die vorliegenden Daten bestätigen daher eine wichtige Rolle der Kollagen Typ IV-vermittelten Adhäsion für die epitheliale Restitution von IEC-6 Zellen. Vergleicht man zusammenfassend die vorliegenden Ergebnisse mit früheren Daten für andere Zelltypen, zeigt sich, daß unterschiedliche Zellen je nach Entwicklungsstand, Ursprung und der Spezies des Donors über divergente Adhäsionsmuster verfügen können.

Die extrazelluläre Matrix dient während der Wanderung der Epithelzellen entlang der Basalmembran von der Kryptenregion bis zu den Villusspitzen und auch in Zeiten einer notwendigen Reepithelialisierung nach Verletzungen der Mukosa als Basis. Die Basalmembran bietet ein Substrat zum Wiederaufbau zerstörten Gewebes bei oberflächlichen Verletzungen, indem sie die Migration der in die Wundheilung involvierten Zellen unterstützt (Harper et al.,

1994). Über den Ursprung der extrazellulären Membran gab es lange Zeit unterschiedliche Auffassungen. Einige Autoren vermuteten, daß ausschließlich die Epithelzellen ihre eigene Basalmembran bilden, während andere Autoren den mesenchymalen Anteil als den wichtigeren betrachteten. Heute weiß man, daß Epithelzellen durchaus in der Lage sind, extrazelluläre Matrixfaktoren zu bilden (Quaroni et al., 1978; McCormack, 1992). Andererseits hat die detaillierte Untersuchung der Basalmembran mit Hilfe von Hybrid-Dünndärmen ergeben, daß zum Beispiel Kollagen Typ IV zu einem frühen Zeitpunkt ausschließlich von Mesenchymzellen gebildet wird, später aber auch Kollagen epithelialen Ursprungs hinzukommt (Simon-Assmann et al., 1990). Es kann also davon ausgegangen werden, daß die Bildung der Matrixkomponenten abhängig vom Entwicklungszustand ist, daß sich aber mesenchymale und epitheliale Zellen am Aufbau der Basalmembran beteiligen. Wichtig für die Untersuchungen zur Migration intestinaler Zellen ist der Nachweis, daß sie in der Lage sind, die Basalmembran wie eine Unterlage zu gebrauchen und auf ihr zu wandern. Dies konnte in verschiedenen Versuchen schlüssig dargelegt werden. Trier et al. (1990) verwendeten zum Beispiel einen Laminin-Antikörper zur Markierung der Basalmembran und konnten zeigen, daß der Umsatz der Basalmembran ungefähr sechs Wochen benötigt. Welche Faktoren der Basalmembran die Epithelzellfunktion entlang der Krypten-Villus-Achse modulieren können, sollte die Untersuchung der Migration von IEC-6 Zellen auf Kollagen Typ IV, Fibronektin und Laminin darlegen.

Das *In vitro* Wundheilungsmodell zur Untersuchung der IEC-6 Zellmigration, welches von McCormack et al. (1992) entwickelt wurde, bot für die Fragestellung der Migration auf Matrixfaktoren einige Schwierigkeiten. Das nicht kalkulierbare Ausmaß der Zerstörung der aufgetragenen Matrix war der Anlaß ein neues Modell zur Bearbeitung dieser Fragestellung zu suchen. Ein Modell von Pratt et al. (1984) mit Teflon-Rahmen schien ein geeigneter Ansatz und war zudem auch schon zur Untersuchung der Migration von Caco-2 Zellen eingesetzt worden (Basson et al., 1992). Die aus den USA zugesandten Zylinder erwiesen sich als nicht geeignet und so wurden unter Beteiligung der Feinwerkstatt der Tumorforschung (Universitätsklinikum Essen) eigene rostfreie Stahlzylinder entwickelt, die den Anforderungen entsprachen. Das Modell bietet gegenüber anderen Versuchsanordnungen zudem den Vorteil, daß keine Zellen verletzt werden müssen, sondern lediglich aus ihrer Kontaktinhibition entlassen werden. Die Ausbreitung von Zellen stellt einen wichtigen Gesichtspunkt der Migration dar, denn mit Beginn der Wanderung flachen sich die Epithelzellen ab und bilden an der Migrationsfront cytoplasmatische Ausläufer. Die Zellen gebrauchen also ihre maximale Oberfläche, um die zellfreien Bereiche abzudecken. Sie behalten ihre abgeflachte Erscheinung bei, bis sie wieder Kontakt zu benachbarten Zellen haben (Moore et al., 1989). Die Ausbreitung der IEC-6 Zellen in den vorliegenden Untersuchungen war für Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronektin signifikant höher gegenüber der Kontrolle auf Plastik. Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede zwischen den einzelnen Matrixfaktoren. Im Gegensatz hierzu konnten Moore et al. (1992) eine stärkere Ausbreitung auf Kollagen Typ IV vor Laminin in Enterozyten aus dem Meerschweinchen finden. Der Unterschied mag darin begründet sein, daß es sich um ausdifferenzierte Epithelzellen handelt, die andere Anforderungen an die Basalmembran haben als undifferenzierte Kryptenzellen. Die Fähigkeit von Fibronektin die Ausbreitung einer Vielzahl von Zellen zu vermitteln, wurde von Pierschbacher und Ruoslahti (1984) im Zusammenhang mit der für die Adhäsion verantwortlichen RGDS-Sequenz in Proteinen dargestellt.

Obwohl die Ausbreitung auf allen Matrixfaktoren annähernd gleich war, zeigten sich Unterschiede bezüglich der Migration. Die Migration von IEC-6 Zellen wurde am deutlichsten auf Laminin stimuliert, im Anschluß daran folgten Fibronectin und Kollagen Typ IV, die sich ebenso von der Kontrolle signifikant unterschieden. Mit diesen Ergebnissen zeigt sich, daß der wesentlichste Faktor der Adhäsion die Migration am wenigsten stimuliert. Dies erscheint logisch, da das Knüpfen fester Bindungen die Migration verlangsamen kann. Die Bedeutung für Laminin bezüglich der Migration konnte von Lin und Bertics (1995) in einem Fibroblastenmodell dargestellt werden. Fibroblasten, die eine Lamininbindungsaktivität besaßen, zeigten eine wesentlich höhere Migrationsfähigkeit, als solche, denen diese Eigenschaft fehlte. Ein Erklärungsansatz für die besondere Rolle von Laminin in Wundheilungsvorgängen liefern Kurpakus et al. (1990), die das frühe Auftreten dieser Basalmembrankomponente in den Adhäsionsplaques und Hemidesmosomen von humanen Keratinozyten und dem Epithel der Cornea von Rindern feststellten (Carter et al., 1990; Kurpakus et al., 1990). Die Ausbildung derartiger Strukturen, die einen Informationsfluß zwischen den Zellen und dem Substrat bewirken, verändern die Mobilität der Zellen mit Hilfe von Cytoskelettmodulationen. Interessant im Zusammenhang mit der Laminin-stimulierten Migration ist auch die Beobachtung eines divergenten Verteilungsmusters von Lamininketten entlang der Krypten-Villus-Achse. So finden sich beim Menschen die β 1- und γ 1-Ketten in der Basalmembran der Krypten und der Villi. Dagegen ist die α 1-Kette nur in den Villusspitzen und die α 2-Kette vorwiegend in der Kryptenregion lokalisiert (Beaulieu & Vachon, 1994). Die geographische Variabilität könnte in Verbindung mit den Funktionen während der Migration entlang der Krypten-Villus-Achse stehen. Die Beteiligung von Laminin an Wundheilungsprozessen wurde zudem auch schon für Caco-2 Zellen gezeigt (Basson et al., 1992a und b). Gegensätzliche Beobachtungen machten Göke et al. (1996), die bei Zugabe eines Antiserums gegen Laminin keine Beeinträchtigung der IEC-6 Zellmigration beobachten konnten. Die Autoren räumen in ihrer Diskussion allerdings ein, daß das Antiserum unter Umständen nicht alle Bindungsstellen blockieren kann. Obwohl Laminin die Migration der IEC-6 Zellen am deutlichsten stimulieren konnte, bewirkten auch Fibronectin und Kollagen Typ IV eine Steigerung der Migration gegenüber der Kontrolle. Basson et al. (1992) beschreiben auch für Fibronectin die Migrationsförderung in Caco-2 Zellen. Auch bei geschichteten Epithelien wie Keratinozyten (Sarret et al., 1992; O'Keefe et al., 1995) und den Zellen des Corneaepithels (Nishida et al., 1983) konnte eine Fibronectin-abhängige Zellmigration festgestellt werden. In IEC-6 Zellen belegte die verminderte Wanderung der Zellen nach Zugabe spezifischer Peptide, die Fibronectin-Bindungsstellen blockieren, die funktionelle Rolle dieses Matrixfaktors (Göke et al., 1996). Auch Kollagen IV übt in einer Vielzahl von Zellen positive Einflüsse auf die Migration aus. Dies gilt für die erleichterte Restitution nach oberflächlichen Mukosaverletzungen im Meerschweinchendarm in Anwesenheit von Kollagen Typ IV (Moore et al., 1992) ebenso wie für die Migrationshemmung bei Zellkulturuntersuchungen mit IEC-6 Zellen, bei denen die funktionale, nicht-kollagenöse NC1-Domäne von Kollagen Typ IV mit Hilfe von Antikörpern blockiert wurde (Göke et al., 1996). Alle Daten belegen, in Einklang mit Beschreibungen in der Literatur, eine zentrale Bedeutung der extrazellulären Matrixfaktoren Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV für die intestinale epitheliale Migration, als dem initialen Schritt der Wundheilung.

Im Anschluß an die Migration folgt sowohl bei der intestinalen Wundheilung, als auch während der kontinuierlichen Regeneration des Mukosaepithels die Zellproliferation zur Komplementierung des Zellpools. Der Zellverlust entsteht entweder durch die physiologisch bedingte Abschilferung ausdifferenzierter Enterozyten in das Lumen oder aber durch verletzungsbedingten Zelluntergang. Die Relevanz der Basalmembran für die epitheliale Proliferation ergibt sich auch aus der Tatsache, daß während der Migration intestinaler Epithelzellen entlang der Krypten-Villus-Achse ein Übergang zwischen proliferativen und differenzierenden Einflüssen stattfinden muß. Die Regulation dieses Mechanismus ist bis heute nicht verstanden. Da aber die Basalmembran während dieser Veränderungen ein stetiger Partner ist, der wechselnde Einflüsse auf die intestinalen Epithelzellen ausüben könnte, stehen die extrazellulären Matrixkomponenten bei der Untersuchung proliferationsmodulierender und differenzierungsinitiierender Prozesse im Mittelpunkt des Interesses. Einer Theorie von Simo et al. (1991) zur Folge, sind Veränderungen in der Zusammensetzung der Basalmembran von den Krypten bis zur Villusspitze an der Regulation beteiligt. Diese Auffassung wird unterstützt durch die Tatsache, daß die Expression einzelner Laminin-Isoformen und Fibronektin entlang der Basalmembran verschieden ist (Simo et al., 1991; Beaulieu, 1992; Beaulieu & Vachon, 1994). Im Zusammenhang mit der Proliferation von IEC-6 Zellen zeigen interessante Untersuchungen von Carrol et al. (1988), daß die epitheliale Proliferation *in vitro* auf Basalmembranextrakten von EHS-Tumoren inhibiert wird. In Untersuchungen von Mikami et al. (1994) wurde die Proliferation von Magenepithelzellen zeitabhängig durch extrazelluläre Matrixfaktoren moduliert. Dies bestätigte sich in den eigenen Experimenten, die die Proliferation nach 24, 48 und 72 Stunden untersuchten. Dieser Untersuchungszeitraum umfaßt eine Zeitspanne, in der die Erneuerung des Epithels normalerweise abgeschlossen ist. Die IEC-6 Zellproliferation war nach 24 Stunden auf Kollagen-Typ IV erhöht, nach 48 Stunden zeigte sich eine Stimulation sowohl auf Kollagen Typ IV und Fibronektin. Die Summe der Einflüsse ergibt damit eine proliferationsstimulierende Wirkung im Gegensatz zu den Beobachtungen von Carroll et al. (1988) für IEC-6 Zellen, die unter Verwendung eines Basalmembranextrakts als Matrix eine Proliferationshemmung zeigten. Diese Unterschiede spiegeln eine Schwierigkeit der Untersuchung isolierter extrazellulärer Membrankomponenten wider. Die Ergebnisse der Einzelkomponenten sind nicht unbedingt übertragbar auf die Basalmembran als Ganzes. Die extrazelluläre Matrix stellt ein Netzwerk unterschiedlicher Faktoren dar, und es ist denkbar, daß es aufgrund der Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten zu einer Mimikrierung und Demaskierung einzelner Bindungsstellen kommt. Dennoch erlaubt die Charakterisierung der Effekte einzelner Matrixfaktoren ein Grundverständnis und hilft zudem bei der Identifizierung von Interaktionen und der Aufklärung membranbedingter Fehlfunktionen. Laminin hatte nach 24 und 48 Stunden keinerlei Einfluß auf die Proliferation, ebenso wie Kollagen Typ IV und Fibronektin bei der Untersuchung nach 72 Stunden. Im Gegensatz dazu war die IEC-6 Zellproliferation nach 72 Stunden auf Laminin signifikant inhibiert. Die Daten stimmen überein mit Beobachtungen von Wolpert et al. (1996), die eine verringerte Proliferation von IEC-6 Zellen auf Laminin im Vergleich zu Kollagen Typ I beschreiben. Erstaunlich bei diesen Versuchen ist die Tatsache, daß auch bei Gabe von Wachstumsfaktoren, die die intestinale epitheliale Proliferation fördern, der inhibitorische Effekt erhalten bleibt. Auch Weiser et al. (1990) beobachteten in Enterozyten aus dem Jejunum und Ileum männlicher Albinoratten, die auf einer Laminin-Matrix wachsen, eine Proliferationsinhibition nach 72 Stunden. Laminin gilt in verschiedenen Zellen und Geweben als Induktor von

Differenzierungsvorgängen. In Studien von Hahn et al. (1990) konnte gezeigt werden, daß Laminin die Differenzierung in fetalen Rattenenterozyten fördert. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß zum Zeitpunkt des Beginns der intestinalen Differenzierung in Rattenfeten (16 bis 18 Tage nach der Befruchtung) die Lamininsyntheserate am höchsten ist verglichen mit neugeborenen oder adulten Ratten (Simo et al., 1991). Eine weitere Beobachtung von Olson et al. (1991) unterstreicht die Bedeutung von Laminin für die Differenzierung. Anti-Laminin-Antikörper, die gegen das Pentapeptid gerichtet sind, unterbinden die Ausbildung Krypten-ähnlicher multizellulärer Strukturen in dreidimensionalen EHS-Gelen. Da einhergehend mit der Differenzierung die Proliferation intestinaler Epithelzellen abnimmt, deuten die vorliegenden Daten auf eine Beteiligung von Laminin an der Differenzierung von IEC-6 Zellen hin. Eine begrenzte Differenzierung von IEC-6 Zellen ist möglich, wie Autoren sie zum Beispiel nach TGF β -Applikation in der Zellkultur beschreiben (Kurokawa et al., 1987).

TGF β spielt eine zentrale Rolle während der intestinalen Wundheilung und moduliert die epitheliale Migration und Proliferation von IEC-6 Zellen. Die Regulation der Expression von TGF β ist nicht vollständig charakterisiert. Es gibt Hinweise, daß auch extrazelluläre Matrixfaktoren in der Lage sind, Einfluß auf die Zytokinexpression zu nehmen. Hierbei wird eine Beteiligung des Cytoskeletts diskutiert. Extrazelluläre Matrixkomponenten regulieren ihre Wirkung über die Interaktion mit Rezeptoren, die wiederum an das Cytoskelett gekoppelt sein können und die Reorganisation von Actinfilamenten bewirken. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß eine Reorganisation des Cytoskeletts in der Lage ist, die Expression von TGF β 1 in dermalen Fibroblasten auf mRNA-Ebene zu modulieren (Varedi et al., 1995). Benya et al. (1993) beschreiben die Veränderung der mRNA-Expression des IGF1-Rezeptors in IEC-18 Zellen nach Wachstum auf einem Basalmembranextrakt. In IEC-6 Zellen konnte zudem nach Wachstum auf Laminin die Abnahme der Expression des EGF-Rezeptors beobachtet werden (Wolpert et al., 1996b). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ergibt sich für IEC-6 Zellen, die auf Kollagen Typ IV, Laminin oder Fibronectin gewachsen waren, keine Modulation der TGF β -Expression. Andere Ergebnisse erzielten Streuli et al. (1993) in Brustdrüsenepithelzellen aus Mäusen. Die mRNA-Expression von TGF β 1 wurde herabreguliert in Zellen, die Kontakt mit endogen synthetisierten oder exogen verabreichten Basalmembrankomponenten hatten. Als Ursache konnte eine veränderte TGF β 1-Promotoraktivität festgestellt werden. Die Untersuchung der Expression von TGF β 2 veränderte sich in diesem Modell nicht. Die Resultate der Arbeit von Streuli et al. (1993) belegen, daß die Basalmembran ein wichtiger Regulator der TGF β 1-Synthese ist. Die TGF β -Expression ist auf mehreren Stufen regulierbar, daher ist es denkbar, daß die Peptidlevel durch extrazelluläre Matrixfaktoren verändert werden. Die Mechanismen der Bioaktivierung von TGF β sind nicht vollständig aufgeklärt. Man vermutet die Beteiligung von Proteasen wie Plasmin an diesem Vorgang (Lyons et al., 1990). Extrazelluläre Matrixfaktoren sind neben der Induktion der Genexpression von Zytokinen und Zytokin-Rezeptoren auch in der Lage, die Expression von Proteasen wie z.B. Kollagenase zu bewirken (Werb et al., 1993). In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Nakajima et al. (1997) von besonderem Interesse. Sie konnten mit Hilfe ihrer Experimente zur Bedeutung von TGF β während der Embryogenese zeigen, daß das

latente TGF β -Bindungsprotein-1 (LTB1) mit der extrazellulären Matrix über eine Plasmin-sensitive Sequenz verbunden ist und zur Bioaktivierung des latenten Komplexes beiträgt. Diese Untersuchungen belegen eine direkte Wechselwirkung zwischen der extrazellulären Membran und der Entlassung von TGF β aus dem latenten Komplex. Um zu untersuchen, ob die extrazellulären Matrixfaktoren Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin eine Aktivierung des latenten TGF β -Komplexes bewirken und so die Veränderung der Proteinmengen von TGF β in IEC-6 Zellen veranlassen, wurden die Proteinmengen des bioaktiven und latenten TGF β s in den Zellkulturüberständen untersucht. Dabei wurde gezeigt, daß es zu keiner Änderung der TGF β -Proteinsynthese oder der Aktivierung latenten TGF β s nach Wachstum von IEC-6 Zellen auf den untersuchten Basalmembrankomponenten kommt. Sollte die Wirkung von TGF β im Zusammenhang mit den extrazellulären Matrixfaktoren dennoch modifiziert werden, so wären an diesem Vorgang wahrscheinlich TGF β -Rezeptoren beteiligt. Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse zum Einfluß extrazellulärer Matrixfaktoren auf IEC-6 Zellen während der epithelialen Wundheilung, so sind eine Vielzahl von Modulationen festgestellt worden. Involviert in die Interaktionen der extrazellulären Matrix mit IEC-6 Zellen sind vor allen Dingen die Rezeptoren, die zur Integrin-Familie gehören. Zur weitergehenden Einordnung der Wechselwirkungen müssen zukünftig Untersuchungen zur Expression der an den epithelialen Wundheilungsvorgängen beteiligten Integrine vorgenommen werden.

Diese Seite ist in Diskussion
Seite 100 fortgesetzt,
wegen der Fußzeile

lationen festgestellt worden. Involviert in die Interaktionen der extrazellulären Matrix mit IEC-6 Zellen sind vor allen Dingen die Rezeptoren, die zur Integrin-Familie gehören. Zur weitergehenden Einordnung der Wechselwirkungen müssen zukünftig Untersuchungen zur Expression der an den epithelialen Wundheilungsvorgängen beteiligten Integrine vorgenommen werden.

4.3 Beschreibung der Wirkung von Adeninnukleotiden auf die Expression extrazellulärer Matrixfaktoren in verwundeten und intakten IEC-6 Monolayern

Die Regulation der Expression von extrazellulären Matrixfaktoren im Rahmen der intestinalen Wundheilung ist bisher nicht gut charakterisiert. Für TGF β , das eine essentielle Rolle bei diesen Vorgängen spielt, konnte eine modulatorische Funktion festgestellt werden. In Untersuchungen von Mustoe et al. (1991) konnten neben wundheilungsfördernden auch negative Einflüsse, wie die Vernarbung und Fibrose gezeigt werden. TGF β kann in IEC-6 Zellen nach Verwundung die Expression extrazellulärer Matrixfaktoren stimulieren (Göke et al., 1996). Auch Adeninnukleotide sind, wie die vorliegenden Untersuchungen demonstrieren konnten, bedeutende Modulatoren der intestinalen epithelialen Wundheilung. Daher lag es nahe zu untersuchen, ob auch Adeninnukleotide, ähnlich wie TGF β , in der Lage sind, die Expression der Basalmembrankomponenten Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronektin zu verändern. In Untersuchungen von Sud'ina et al. (1998) bewirkte ATP die Modulation der Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen. Das Gleiche gilt auch für die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen (Fredholm et al., 1997). Für beide Beobachtungen wird die Beteiligung von Purinrezeptoren diskutiert. Außerdem konnte gezeigt werden, daß ATP in der Lage ist, die Genexpression zu verändern. So induziert ATP die Expression von Cyclin A (Yang et al., 1997) und ADP bewirkt die Expressionserhöhung des Transferrin-Rezeptors (Kartha et al., 1987). Auch eine Aktivierung von Genen, die an der Zellzyklusregulation beteiligt sind, ist in den glatten Muskelzellen von Rattenaorten beschrieben worden (Malam-Souley et al., 1983). Die Untersuchung einer möglichen Expressionsmodifikation in IEC-6 Zellen konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu den von Göke et al. (1996) erhobenen Daten, zeigte sich auch keine Herabregulierung der Fibronektin- und Laminin β 1-Expression sechs Stunden nach der Verwundung. Unterschiedlich ist zudem auch, daß in den vorliegenden Versuchen das Kollagen Typ IV α 1 Transkript detektiert werden konnte, während Göke et al. (1996) die Abwesenheit dieser Kollagen-Kette beschreiben. Vielmehr veränderte sich die Expression der Matrixfaktoren weder nach der Verwundung noch nach der Applikation von ADP oder ATP. Diese Beobachtungen schließen eine Beeinflussung extrazellulärer Matrixfaktoren durch Adeninnukleotide nicht aus, wenn man bedenkt, daß auch eine Proteinmodifikation möglich ist. So könnte eine Inhibition oder Stimulierung von Proteasen, die am Abbau extrazellulärer Matrixfaktoren beteiligt sind, von Adeninnukleotiden bewirkt werden. Wenn man berücksichtigt, daß die Applikation von Adeninnukleotiden in einer Vielzahl von Zellen zu Veränderungen des adhäsiven Verhaltens von Zellen führt (Sponsel et al., 1995), müßte auch in diesem Zusammenhang die Beteiligung von Integrinen näher untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Das intestinale Epithel stellt die entscheidende Barriere zwischen dem Organismus und der Außenwelt dar. Es schützt ihn vor einer Vielzahl schädigender Substanzen, die sich im gastrointestinalen Lumen befinden. Im Zuge von Verletzungen ist die intestinale Mukosa zu einer raschen Regeneration und Wiederherstellung der Integrität befähigt. In diese Vorgänge sind die Migration, Proliferation und Differenzierung intestinaler Epithelzellen involviert. Eine Vielzahl von Faktoren, die die intestinale Wundheilung beeinflussen können, sind in den letzten Jahren identifiziert worden. Zu ihnen gehört vor allem die große Gruppe der Zytokine. Die Beteiligung von Adeninnukleotiden und Komponenten der Basalmembran wurde für verschiedene Epithelschädigungen außerhalb des Intestinaltrakts beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Einflußnahme dieser Faktoren auf die intestinale epitheliale Wundheilung in einem *In vitro* Modell untersucht und weitergehend charakterisiert.

Adeninnukleotide, die aus verletzten Zellen der intestinalen Mukosa in großen Mengen freigesetzt werden können, sind in der Lage, die Migration und Proliferation intestinaler Epithelzellen zu modulieren. ADP und ATP haben sich in den vorliegenden Untersuchungen als potente Stimulatoren der intestinalen epithelialen Migration und starke Inhibitoren der intestinalen epithelialen Proliferation erwiesen. Der Einsatz von Suramin, ATP-Analoga und die Erstellung eines pharmakologischen Profils identifizierte den Purinrezeptor P2x als verantwortlich für die Hemmung der epithelialen Proliferation, nicht aber als Vermittler der intestinalen Migrationsstimulation. Dies belegt die unabhängige Modulation der beiden Vorgänge durch Adeninnukleotide. Die Adeninnukleotid-vermittelten Effekte sind nicht TGF β -abhängig, und sie verursachen in IEC-6 Zellen weder Nekrose noch Apoptose. Die Signalübertragung der Proliferationshemmung steht in Zusammenhang mit MAP-Kinase-Aktivierungen. Die Bedeutung extrazellulärer Matrixfaktoren ergibt sich aus der Tatsache, daß sie in ständiger Verbindung mit den Epithelzellen der intestinalen Mukosa stehen. Die erhobenen Daten belegen, daß Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin die intestinale Adhäsion, Migration und Proliferation beeinflussen. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß IEC-6 Zellen über Rezeptoren zur Bindung aller untersuchten Basalmembrankomponenten verfügen. Kollagen Typ IV erwies sich als starker Stimulator der epithelialen Adhäsion. Laminin förderte maximal die epitheliale Migration und hemmte gleichzeitig die Proliferation. Dies weist auf eine Bedeutung in Phasen mit geringer Wachstumsrate hin, und steht in Einklang mit der Rolle von Laminin in Differenzierungsprozessen. Die Gegenwart dieser Basalmembrankomponenten bewirkte keine Änderung der TGF β -mRNA-Expression, der TGF β -Peptidmengen oder aber des Aktivitätsstatus dieses Wachstumsfaktors in IEC-6 Zellen. Es existiert also kein Feedback-Regulationsmechanismus zwischen den untersuchten extrazellulären Matrixfaktoren und dem Wachstumsfaktor TGF β . Die vorliegenden Experimente konnten zudem beweisen, daß ADP- und ATP-Applikation und Verwundung keine mRNA Expressionsänderung von Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin in IEC-6 Zellen bewirken.

Die vorliegenden Untersuchungen belegen daher schlüssig, daß neben den bisher bekannten Faktoren auch Adeninnukleotide und extrazelluläre Matrixfaktoren die intestinale epitheliale Wundheilung in vielfältiger Weise modulieren. Für das weitere Verständnis intestinaler Wundheilungsvorgänge durch Adeninnukleotide und Basalmembrankomponenten erscheint eine

weitergehende Charakterisierung der Purinrezeptoren sowie Rezeptoren der extrazellulären Matrixfaktoren auf den Epithelzellen, den sogenannten Integrinen, sinnvoll.

6 Tabellenanhang

Kapitel 3.1.1

Tabelle 5:

Einfluß verschiedener Adeninnukletoide auf die Migration von IEC-6 Zellen *in vitro*

Adeninnukleotid (Konzentration in μM)	Migration in % Mittelwert (aus 3 oder 4 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
AMP 10 μM	103,7	27,3
AMP 50 μM	108,4	11,8
AMP 100 μM	111,3	7,1
AMP 250 μM	117,3	15,3
ADP 10 μM	114,6	19,9
ADP 50 μM	122,2	23,4
ADP 100 μM	203,9	40,1
ADP 250 μM	232,2	40,1
ATP 10 μM	118,1	12,9
ATP 50 μM	107,2	4,8
ATP 100 μM	205,2	15,6
ATP 250 μM	244,6	6,8

Kapitel 3.1.2

Tabelle 6:

Untersuchungen zur TGF β -Abhängigkeit der ADP/ATP-vermittelten Migrationsstimulation

Adeninnukleotid und Antikörper (Konzentration in μM und $\mu\text{g/ml}$)	Migration in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
ADP 250 μM	224,3	14,6
ADP 250 μM + aTGF β [30 $\mu\text{g/ml}$]	170,5	21,9
ATP 250 μM	203,7	37,6
ATP 250 μM + aTGF β [30 $\mu\text{g/ml}$]	173,3	13,8

Kapitel 3.1.3**Tabelle 7:**

Einfluß verschiedener Adeninnukleotidkonzentrationen auf die Proliferation von IEC-6 Zellen in vitro

Adeninnukleotid (Konzentration in μM)	Proliferation in % Mittelwert (aus 3-5 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
AMP 10 μM	99,3	5,2
AMP 50 μM	86,1	8,3
AMP 100 μM	70,5	2,4
AMP 250 μM	54,8	19,3
ADP 10 μM	97,0	1,4
ADP 50 μM	70,5	7,0
ADP 100 μM	56,9	3,5
ADP 250 μM	36,2	5,2
ATP 10 μM	101,3	13,8
ATP 50 μM	75,8	15,4
ATP 100 μM	62,0	12,9
ATP 250 μM	35,6	7,6

Kapitel 3.1.4**Tabelle 8:**

Untersuchungen zur TGF β -Abhängigkeit der ADP/ATP-vermittelten Proliferationshemmung

Adeninnukleotid und Antikörper (Konzentration in μM und $\mu\text{g/ml}$)	Migration in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
ADP 250 μM	22,5	1,6
ADP 250 μM + aTGF β [30 $\mu\text{g/ml}$]	21,6	1,3
ATP 250 μM	18,3	2,9
ATP 250 μM + aTGF β [30 $\mu\text{g/ml}$]	18,4	2,9

Kapitel 3.1.5**Tabelle 9:**

Untersuchungen zur Proliferationsmodulation von IEC-6 Zellen bei gleichzeitiger Applikation von ADP und ATP

Adeninnukleotid (Konzentration in μM)	Proliferation in % Mittelwert (aus 3-5 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
ADP 250 μM	39,0	12,5
ATP 250 μM	36,4	13,6
ADP + ATP je 250 μM	39,9	16,2

Tabelle 10:

Einfluß von verschiedenen Purinrezeptoragonisten auf die Proliferation von IEC-6 Zellen

Adeninnukleotid/ Purinrezeptoragonist (Konzentration in μM)	Proliferation in % Mittelwert (aus 3-4 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
UTP 250 μM	86,5	14,4
MeSATP 250 μM	74,6	26,3
ADP 250 μM	48,4	9,4
ATP 250 μM	45,8	6,5
$\beta\gamma\text{Me-ATP}$ 250 μM	36,9	4,2

Tabelle 11:

Untersuchung zur Wirkung von Suramin allein oder in Kombination mit ADP, ATP auf die Proliferation von IEC-6 Zellen

Adeninnukleotid/ Suramin (Konzentration in μM)	Proliferation in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
ADP 250 μM	42,5	11,1
ATP 250 μM	39,6	10,5
Suramin 50 μM	143,6	18,3
ADP 250 μM + Suramin 50 μM	25,5	7,4
ADP 250 μM + Suramin 50 μM	29,3	10,4

Tabelle 12:

Untersuchung zur Minderung der ADP/ATP-vermittelten Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen durch gleichzeitige Applikation von 250 μ M UTP

Adeninnukleotid/ Purinrezeptoragonist (Konzentration in μ M)	Proliferation in % Mittelwert (aus 4 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
ADP 250 μ M	33,6	15,2
ATP 250 μ M	36,1	13,5
UTP 250 μ M	86,9	11,2
ADP + UTP je 250 μ M	85,5	6,1
ATP + UTP je 250 μ M	83,5	4,6

Tabelle 13:

Einfluß verschiedener Konzentrationen des Purinrezeptoragonisten UTP auf die Proliferation von IEC-6 Zellen

Purinrezeptoragonist (Konzentration in μ M)	Proliferation in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
UTP 5 μ M	104,0	15,0
UTP 10 μ M	101,5	14,9
UTP 25 μ M	96,6	9,6
UTP 50 μ M	98,5	6,5
UTP 100 μ M	96,6	2,4
UTP 150 μ M	100,0	7,2
UTP 250 μ M	103,7	6,6

Tabelle 14:

Konzentrationsstudie zum Effekt von UTP, welches die ADP-vermittelte Proliferationshemmung auf IEC-6 Zellen verringert

Adeninnukleotid/ Purinrezeptoragonist (Konzentration in μ M)	Proliferation in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
ADP 250 μ M	52,3	16,8
ADP 250 μ M + UTP 5 μ M	62,0	9,8

ADP 250 μ M + UTP 10 μ M	64,9	3,4
ADP 250 μ M + UTP 25 μ M	73,4	4,2
ADP 250 μ M + UTP 50 μ M	79,4	2,6
ADP 250 μ M + UTP 100 μ M	86,4	16,7
ADP 250 μ M + UTP 150 μ M	89,6	13,6
ADP 250 μ M + UTP 250 μ M	93,4	11,8

Tabelle 15:

Konzentrationsstudie zum Effekt von UTP, welches die ATP-vermittelte Proliferationshemmung auf IEC-6 Zellen verringert

Adeninnukleotid/ Purinrezeptoragonist (Konzentration in μ M)	Proliferation in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
ATP 250 μ M	56,0	18,6
ATP 250 μ M + UTP 5 μ M	64,6	17,6
ATP 250 μ M + UTP 10 μ M	70,7	15,1
ATP 250 μ M + UTP 25 μ M	76,5	8,3
ATP 250 μ M + UTP 50 μ M	88,6	8,2
ATP 250 μ M + UTP 100 μ M	89,5	11,0
ATP 250 μ M + UTP 150 μ M	93,4	5,9
ATP 250 μ M + UTP 250 μ M	92,6	2,8

Kapitel 3.1.6

Tabelle 16:

Einfluß des Purinrezeptoragonisten β gMethylen-ATP auf die Migration von IEC-6 Zellen

βgMethylen-ATP (Konzentration in μ M)	Migration in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
β gMe-ATP 50 μ M	101,8	13,2
β gMe-ATP 125 μ M	107,9	18,6
β gMe-ATP 250 μ M	120,3	28,1

Kapitel 3.1.7

Tabelle 17:

Messung der MAP-Kinase-Aktivität in IEC-6 Zellen nach Applikation von 250 μ M ADP, ATP oder β gMe-ATP

Aktivität in pmol/mg/min				
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
Kontrolle	318	541	1702	966
ADP 250 μ M	1478	756		1511
ATP 250 μ M	2522	1066	2261	1237
β gMe-ATP 250 μ M		959	2375	1586

Kapitel 3.1.8**Tabelle 18:**

Einfluß der Adeninnukleotide ADP und ATP auf die Vitalität von IEC-6 Zellen mit Hilfe einer Trypanblau-Vitalfärbung

Adeninnukleotid (Konzentration in μ M)	vitale Zellen in % (\pm Standardabweichung)	letale Zellen in % (\pm Standardabweichung)
Kontrolle	96,8 \pm 0,8	3,2 \pm 0,8
ADP 250 μ M	95,8 \pm 2,1	4,2 \pm 2,1
ATP 250 μ M	96,3 \pm 2,6	3,7 \pm 2,6

Tabelle 19:

Reversibilität der ADP/ATP-vermittelten Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen

Adeninnukleotid (Konzentration in μ M)	Proliferation in %	Proliferationszuwachs in % (72 h nach Entfernen der Adeninnukleotide)
Kontrolle	100	219,8
ADP 250 μ M	27,9	263,3
ATP 250 μ M	24,3	180,3

Tabelle 20:

Reversibilität der β gMe-ATP-vermittelten Proliferationshemmung von IEC-6 Zellen

Adeninnukleotid (Konzentration in μ M)	Proliferation in %	Proliferationszuwachs in % (72 h nach Entfernen der Adeninnukleotide)
Kontrolle	100	136,1
β gMe-ATP 250 μ M	44,2	216,0

Kapitel 3.2.1**Tabelle 21:**

Bestimmung der geeigneten Adhäsionsdauer zur Untersuchung der Anheftung von IEC-6 Zellen

Adhäsionsdauer in h (bei einer Zellzahl von $3,5 \times 10^4$ Zellen)	Absorption (bei 405 nm) Mittelwerte aus 3 Versuchen	Standardabweichung
1	0,043	0,013
2	0,146	0,007
3	0,287	0,011
4	0,280	0,011
5	0,254	0,016

Tabelle 22:

Ermittlung der geeigneten Zellzahl zur Untersuchung der Adhäsion von IEC-6 Zellen

Zellzahl (bei einer Adhäsionsdauer von 3 Stunden)	Absorption (bei 405 nm) Mittelwerte aus 3 Versuchen	Standardabweichung
1×10^4	0,238	0,033
2×10^4	0,451	0,158
3×10^4	0,799	0,172
4×10^4	1,052	0,171

Kapitel 3.2.2

Tabelle 23:

Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit von IEC-6 Zellen an extrazelluläre Matrixkomponenten

Extrazellulärer Matrixfaktor	Adhäsion in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
Laminin	169,5	16,0
Fibronektin	170,3	21,0
Kollagen Typ IV	206,7	19,7

Kapitel 3.2.3

Tabelle 24:

Untersuchung der Migration von IEC-6 Zellen auf extrazellulären Matrixfaktoren unterteilt nach Zonen des Migrationsmodells

Anzahl der Zellen					
Mittelwert \pm Standardabweichung					
Zone:	1	2	3	4	5
Kontrolle	41,4 \pm 3,0	36,2 \pm 0,9	28,9 \pm 4,4	19,5 \pm 7,9	9,2 \pm 7,8
Laminin	30,5 \pm 3,6	27,8 \pm 4,6	26,4 \pm 3,6	24,4 \pm 3,7	20,9 \pm 5,0
Fibronektin	35,6 \pm 7,2	34,2 \pm 7,1	31,3 \pm 6,4	28,3 \pm 6,3	22,2 \pm 4,8
Kollagen Typ IV	31,8 \pm 2,8	27,6 \pm 4,3	24,9 \pm 4,9	21,8 \pm 6,9	18,1 \pm 6,2
Zone:	6	7	8	9	10
Kontrolle	3,2 \pm 4,6	0,4 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Laminin	16,9 \pm 7,3	11,8 \pm 8,8	8,2 \pm 6,2	4,3 \pm 6,7	1,3 \pm 2,2
Fibronektin	13,2 \pm 3,1	6,3 \pm 2,3	1,6 \pm 0,9	0,4 \pm 0,1	0,0 \pm 0,0
Kollagen Typ IV	9,8 \pm 3,1	4,5 \pm 3,7	2,0 \pm 2,6	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

Kapitel 3.2.4

Tabelle 25:

Untersuchung der zeitabhängigen Proliferationsmodulation von IEC-6 Zellen auf extrazellulären Matrixfaktoren unterteilt nach 24 h

Extrazellulärer Matrixfaktor	Proliferation in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
Laminin	96,8	13,2
Fibronektin	105,2	18,6
Kollagen Typ IV	128,8	28,1

Tabelle 26:

Untersuchung der zeitabhängigen Proliferationsmodulation von IEC-6 Zellen auf extrazellulären Matrixfaktoren unterteilt nach 48 h

Extrazellulärer Matrixfaktor	Proliferation in % Mittelwert (aus 3 Versuchen)	Standardabweichung
Kontrolle	100,0	—
Laminin	98,8	18,2
Fibronektin	122,4	10,6
Kollagen Typ IV	131,2	9,9

Tabelle 27:

Untersuchung der zeitabhängigen Proliferationsmodulation von IEC-6 Zellen auf extrazellulären Matrixfaktoren unterteilt nach 72 h

Extrazellulärer	Proliferation in %	Standardabweichung
-----------------	--------------------	--------------------

Matrixfaktor	Mittelwert (aus 3 Versuchen)	
Kontrolle	100,0	—
Laminin	62,9	13,1
Fibronektin	94,2	10,4
Kollagen Typ IV	105,1	13,4

Kapitel 3.2.6

Tabelle 28:

Beispielhafte TGFb-Eichkurvendaten zur Ermittlung einer Regressionsgeraden

TGFb-Standard (Konzentration in pg/ml)	Absorption 1 (bei 450 nm)	Absorption 2 (bei 450 nm)	Absorption Mittelwerte
15,6 pg/ml	0,002	- 0,003	- 0,001
31,3 pg/ml	0,014	0,017	0,016
62,5 pg/ml	0,042	0,027	0,035
125,0 pg/ml	0,077	0,090	0,084
250,0 pg/ml	0,150	0,163	0,157
500,0 pg/ml	0,358	0,334	0,345
1000,0 pg/ml	0,742	0,769	0,756

Tabelle 29:

Untersuchung der Menge Gesamt-TGFb-Peptids in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen nach Wachstum auf extrazellulären Matrixfaktoren

Extrazellulärer Matrixfaktor	Gesamt-TGFb-Peptid [pg/ml] Mittelwerte aus 4 Versuchen	Standardabweichung
Medium	549,2	224,4
Kontrolle	2418,7	600,8
Laminin	2199,4	380,5
Fibronektin	2360,6	273,0
Kollagen Typ IV	2117,4	247,4

Tabelle 30:

Untersuchung der Menge bioaktiven TGF β s in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen nach Wachstum auf extrazellulären Matrixfaktoren

Extrazellulärer Matrixfaktor	bioaktives TGFβ [pg/ml] Mittelwerte aus 4 Versuchen	Standardabweichung
Medium	15,0	10,4
Kontrolle	97,7	42,8
Laminin	114,8	47,4
Fibronectin	107,7	46,3
Kollagen Typ IV	94,9	76,8

Tabelle 31:

Untersuchung der Menge latenten TGF β s in Zellkulturüberständen von IEC-6 Zellen nach Wachstum auf extrazellulären Matrixfaktoren

Extrazellulärer Matrixfaktor	latentes TGFβ [pg/ml] Mittelwerte aus 4 Versuchen	Standardabweichung
Medium	534,2	220,0
Kontrolle	2321,1	593,7
Laminin	2084,6	365,7
Fibronectin	2252,9	288,5
Kollagen Typ IV	2022,5	275,5

7 Literatur

Abbracchio, M.P., Burnstock, G.

Purinoceptors: Are there families of P2x and P2y purinoceptors?
Pharmacological Therapy **64**: 445-475, 1994

Abbracchio, M.P., Saffrey, M.J., Höpker, V., Burnstock, G.

Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum
Neuroscience **59**: 67-76, 1994

Ahn, N.G., Seger, R., Bratlien, R.L., Krebs, E.G.

Growth factor-stimulated phosphorylation cascades: activation of growth factor-stimulated MAP kinase
 In: Interactions among cell signalling systems
Wiley, Chichester, 1992: 113-131

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.

Molekularbiologie der Zelle
VHC-Verlag, 2. Auflage, New York, 1990

Alessi, D.R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S.M., Cohen, P.

Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100 in various cell lines
Current Biology **5**: 283-295, 1995

Ametani, A., Hachimura, S., Yamamoto, Y., Shimizu, M., Imaoka, A., Yi, H.-K., Hashimoto, K., Shuichi, K.

Consecutive events of growth, differentiation and death of the small intestinal epithelial cell line, IEC-6
In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal. **32**:127-130, 1996

Anderson, R.J., Breckon, R., Dixon, B.S.

ATP receptor regulation of adenylate cyclase and protein kinase C activity in cultures of renal LLC-PK₁ cells
Journal of Clinical Investigation **87**: 1732-1738, 1991

Apella, E., Weber, I.T., Blasi, F.

Structure and function of epidermal growth factor like regions in proteins
FEBS Letters **231**: 1-4, 1988

Avery, R.K., Bleier, K.J., Pasternack, M.S.

Differences between ATP-mediated cytotoxicity and cell-mediated cytotoxicity
Journal of Immunology **149**: 1265-1270, 1992

Avruch, J., Zhang, X.-F., Kyriakis, J.M.

Raf meets ras: completing the framework of a signal transduction pathway
Trends in Biochemical Sciences **19**: 279-283, 1994

Babyatsky, M.W., Rossiter, G., Podolsky, D.K.,

Expression of transforming growth factor α and β in colonic mucosa in inflammatory bowel disease
Gastroenterology **110**: 975-984, 1996

Banerjee, D.K., Basu, D.

Purification of normal human urinary n-acetyl- β -hexosaminidase A by affinity chromatography
Biochemical Journal **145**: 113-118, 1975

Barnard, E.A., Webb, T.E., Simon, J., Kunapuli, S.P.

The diverse series of recombinant P2y purinoceptors

In: **Chadwick, D.J., Goode, J.A.**

P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms

John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, Ciba Foundation, 1996: 166-188

Barnard, J.A., Beauchamp, R.D., Coffey, R.J., Moses, H.L.

Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type β

Proceedings of the National Academy of Science **86**: 1578-1582; 1989

Barnard, E.A., Burnstock, G., Webb, T.E.

The cloning of a novel P2 purinoceptor subtypes requires the re-classification of P2y receptors

Trends in Pharmacological Sciences **15**: 280-281, 1994

Barnard, J.A., Lyons, R.M., Moses, H.L.

The cell biology of transforming growth factor β

Biochimica et Biophysica Acta **1032**: 79-87, 1990

Barnard, J.A., Warwick, G.J., Gold, L.

Localizations of TGF β isoforms in the normal small intestine and colon

Gastroenterology **105**: 67-73, 1993

Basson, M.D., Modlin, I.M., Flynn, S.D., Jena, B.P., Madri, J.A.

Independent modulation of enterocyte migration and proliferation by growth factors, matrix proteins, and pharmacologic agents in an *in vitro* model of mucosal healing

Surgery **112** No 2: 299-308, 1992a

Basson, M.D., Modlin, I.M., Madri, J.A.

Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated *in vitro* by extracellular matrix composition and epidermal growth factor

Journal of Clinical Investigation **90**: 15-23, 1992b

Beauchamp, R.D., Sheng, H.M., Shao, J.Y., Thompson, E.A., Ko, T.C.

Intestinal cell cycle regulation interactions of Cyclin D1, Cdk4, and p21^{Cip1}

Annals of Surgery **223**: 620-628, 1996

Beaulieu, J.-F.

Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in human small intestine

Journal of Cell Science **102**: 427-436, 1992

Beaulieu, J.-F., Vachon, P.H.

Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along crypt-villus axis in the human small intestine

Gastroenterology **106**: 829-839, 1994

Beck, K., Hunter, I., Engel, J.

Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein

FASEB Journal **4**: 148-160, 1990

Bell, A.E., Sellers, L.A., Allen, A., Cunliffe, W.J., Morris, E.R., Ross-Murphy, S.B.

Properties of gastric and duodenal mucus: effect of proteolysis, disulfide reduction, bile, acid, ethanol and hypertonicity on mucus gel structure

Gastroenterology **88**: 269-280, 1985

Benya, R.V., Duncan, M.D., Mishra, L., Bass, B.L., Voyles, N.R., Korman, L.Y.

Extracellular matrix composition influences insulinlike growth factor I receptor expression in rat IEC-18 cells

Gastroenterology **104**: 1705-1711, 1993

Birnboim, H.C., Doly, J.

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acid Research **7**: 1513, 1979

Born, G.V.R., Kratzer, M.A.A.

Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man
Journal of Physiology **354**: 419-429, 1984

Boudreau, D.K., Sympton, C.J., Werb, Z., Bissell, M.

Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix
Science **267**: 891-893, 1995

Boeynaems, J.-M., Communi, D., Piroton, S., Motte, S., Parmentier, M.

Involvement of distinct receptors in the actions of extracellular uridine nucleotides
 In: **Chadwick, D.J., Goode, J.A.**
 P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms
John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, Ciba Foundation, 1996: 266-273

Bradford, M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Analytical Biochemistry **72**: 248-253, 1976

Brake, A.J., Wagenbach, M.J., Julius, D.

New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor
Nature **371**: 519-523, 1994

Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R.A., Suprenant, A.

An antagonist-insensitive P2x receptor expressed in epithelia and brain
EMBO Journal **15**: 55-62, 1996

Burgeson, R.E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinmann, H., Martin, G.R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J., Timpl, R., Tryggvason, K., Yamada, Y., Yurchenco, P.D.

A new nomenclature for the laminins
Matrix Biology **14**: 209-211, 1994

Burgeson, R.E., Nimni, M.E.

Collagen Types: Molecular structure and tissue distribution
Clinical Orthopedics **282**: 250-272, 1991

Burnstock, G.

Purinergic nerves
Pharmacological Reviews **24**: 509-581, 1972

Burnstock, G.

A basis for distinguishing two types of purinergic receptor
 In: **Straub, R.W., Bolis, L.**: Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach
Raven, New York: 107-118, 1978

Burnstock, G.

Purinergic mechanism
 In: **Boland, B., Cullinan, J., Mayer, K.M.**: Biological actions of extracellular ATP
Annals of the New York Academy of Sciences **603**: 1-18, 1990

Burnstock, G.

P2 purinoceptors: historical perspective and classification

In: **Chadwick, D.J., Goode, J.A.**

P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms

John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, Ciba Foundation, 1996: 1-34

Burnstock, G., Campbell, G., Bennett, M., Holman, M.E.

Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli

Nature **200**: 581-582, 1963

Burnstock, G., Kennedy, C.

Is there a basis for distinguishing two types of P₂-purinoceptors?

General Pharmacology **16**: 433-440, 1985

Carlin, B., Jaffee, R., Bender, B., Chung, A.E.

Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein

Journal of Biological Chemistry **256**: 5209-5214, 1981

Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B.

Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity

Cancer Research **47**: 943-946, 1987

Carroll, K.M., Wong, T.T., Drabik, D.L., Chang, E.B.

Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix

American Journal of Physiology **254**: G355-G360, 1988

Carter, W.G., Wayner, E.A., Bouchard, T.S., Kaur, P.

The role of integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ in cell-cell and cell-substrate to adhesion of human epidermal cells

Journal of Cell Biology **110**: 1387-1404, 1990

Chang, E.B., Musch, M.W., Mayer, L.

Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine

Gastroenterology **98**: 1518-1524, 1990

Chem, T.

In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain

Experimental Cell Research **104**: 225-262, 1977

Chomczynski, P.

One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA

Annals of Biochemistry **162**: 156-159, 1992

Chomczynski, P., Sacchi, N.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction

Analytical Biochemistry **162**: 156-158, 1987

Ciacchi, C., Lind, S.E., Podolsky, D.K.

Transforming growth factor β regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers

Gastroenterology **105**: 93-101, 1993

Clark, E.A., Brugge, J.S.

Integrins and signal transduction pathways: the road taken

Science **268**: 23-239, 1995

Danielpour, D., Dart, L.L., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B.

Immunodetection and quantitation of the two forms of transforming growth factor β (TGF- β 1 and TGF- β 2) secreted by cells in culture

Journal of Cell Physiology **138**: 79-86, 1989

Dalziel, H.H., Westfall, D.P.

Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization

Pharmacological Reviews **46**: 449-466, 1994

Davenport, H.W., Warner, H.A., Code, C.F.

Functional significance of gastric mucosal barrier to sodium

Gastroenterology **47**: 142-152, 1964

Davies, R.J.

The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway

Journal of Biological Chemistry **268**: 14553-14556, 1993

Denizot, F., Lang, R.

Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability

Journal of Immunological Methods **89**: 271-277, 1986

Dey, B.R., Sukhatme, V.P., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Rauscher, F.J., Kim, S.J.

Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT-1 gene product

Molecular Endocrinology **8**: 595-602, 1994

Dieckgraefe, B.K., Weems, D.M., Santoro, S.A., Alpers, D.H.

ERK and p38 MAP Kinase pathways are mediators in intestinal epithelial wound-induced signal transduction

Biochemical and Biophysical Research Communications **233**: 389-394, 1997

Dignass, A.U.

Untersuchungen zur Modulation intestinaler epithelialer Wundheilungsvorgänge *in vitro* und *in vivo* unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von Zytokinen

Habilitationsschrift, Universität - Gesamthochschule Essen, Essen, 1997

Dignass, A.U., Goebell, H.

Genetics of inflammatory bowel disease

Gastroenterology **11**: 292-297, 1995

Dignass, A.U., Goebell, H.

Injury and healing in the epithelium

In: **Emmrich, J., Liebe, S., Stange, E.F.**: Innovative concepts in inflammatory bowel diseases

Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London, 1999: 188-196

Dignass, A.U., Lynch-Devaney, K., Podolsky, D.K.

Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates intestinal epithelial cell proliferation and migration

Biochemical and Biophysical Research Communications **202** No. 2: 701-709; 1994a

Dignass, A.U., Podolsky, D.K.

Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor β

Gastroenterology **105**: 1323-1332, 1993

Dignass, A.U., Podolsky, D.K.

Peptide growth factors - implication for inflammatory bowel disease
 In: **Rachmilewitz, D.:** Inflammatory bowel diseases
Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London, 1994: 71-81

Dignass, A.U., Podolsky, D.K.

Growth factors and cytokines in inflammatory bowel disease: injury and healing in the epithelium
 In: **Tytgat, G.N.J., Bartelsman, J.F.W.M., van Denter, S.J.H.:** Inflammatory bowel diseases
Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London, 1995: 375-383

Dignass, A.U., Podolsky, D.K.

Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function *in vitro*
Experimental Cell Research **225:** 422-429, 1996

Dignass, A.U., Stow, J.L., Babyatsky, M.W.

Acute epithelial injury in the rat small intestine is associated with expanded expression of transforming growth factors α and β
GUT **38:** 687-693, 1996

Dignass, A.U., Tsunekawa, S., Podolsky, D.K.

Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration
Gastroenterology **106:** 1254-1262, 1994b

Di Virgilio, F., Ferrari, D., Falzoni, S., Chiozzi, P., Munerati, M., Steinberg, T., Baricordi, O.R.

P2 purinceptors in the immune system
 In: **Chadwick, D.J., Goode, J.A.**
 P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms
John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, Ciba Foundation, 1996: 290-305, 1996

Drury, A.N., Szent-Györgyi, A.

The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart
Journal of Physiology **68:** 213-237, 1929

Dubyak, G.R.

Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **4:** 295-300, 1991

Dubyak, G.R., El-Moatassim, C.E.

Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides
American Journal of Physiology **265:** C577-C606; 1993

Dunn, P.M., Blakeley, A.G.H.

Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse *vas deferens*
British Journal of Pharmacology **93:** 243-245, 1988

Eccles, J.C.

The physiology of synapses
Springer Verlag, Berlin, 1964

Edelmann, G.M.

Morphoregulation
Dev Dyn **193:** 2-10, 1992

Engvall, E.

Laminin variants: why, where and when?
Kidney International **43:** 2-6, 1993

Ekblom, P., Vestweber, D., Kemler, R.

Cell-matrix interactions and cell adhesion during development
Annual Reviews in Cell Biology **2**: 27-49, 1986

Feil, W., Wenzl, E., Vattay, P., Starlinger, M., Sogukoglu, T., Schiessel, R.

Repair of rabbit duodenal mucosa after acid injury *in vivo* and *in vitro*
Gastroenterology **92**: 1973-1986; 1987

Feneis, H, Dauber, W..

Anatomisches Bildwörterbuch
 Thieme Verlag, 8. Auflage, Stuttgart, 1998

Flaumenhaut, R., Abe, M., Mignatti, P., Rifkin, D.B.

Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity
Journal of Cell Biology **118**: 901-909, 1992

Fort, P., Piechaczyk, M., El Sabrouty, S., Dani, C., Jeanteur, P., Blanchard, J.M.

Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family
Nucleic Acids Research **13**: 1431-1442, 1985

Fredholm, B.B.

Purines and neutrophil leukocytes
Genetics in Pharmacology **28**: 345-350, 1997

Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Leff, P., Williams, M.

VI nomenclature and classification of purinoceptors
Pharmacological Reviews **46**: 143-156, 1994

Frick, H., Leonhardt, H., Starck, D.

Allgemeine Anatomie
 Thieme Verlag, 4. Auflage, Stuttgart, 1992

Friedberg, I., Kübler, D.

The role of surface protein kinase in the ATP-induced growth inhibition in transformed mouse fibroblasts
 In: **Boland, B., Cullinan, J., Mayer, K.M.**: Biological actions of extracellular ATP
Annals of the New York Academy of Sciences **603**: 513-515, 1990

Gardella, R., Colombi, C., Barlati, S.

A new TaqI RFLP of the human fibronectin (FN1) gene
Nucleic Acids Research **17**: 10520-10521, 1989

Göke, M., Kanai, M., Lynch-Devaney, K., Podolsky, D.K.

Rapid mitogen-activated protein kinase activation by transforming growth factor α in wounded rat intestinal epithelial cells
Gastroenterology **114**: 697-705, 1998

Göke, M., Podolsky, D.K.

Regulation of mucosal epithelial barrier
Baillière's Clinical Gastroenterology **10**: 393-405, 1996

Göke, M., Zuk, A., Podolsky, D.K.

Regulation and function of extracellular matrix in intestinal epithelial restitution *in vitro*
American Journal of Physiology **271**: G729-G740, 1996

Gordon, J.L.

Extracellular ATP: effects, sources and fate
Biochemical Journal **233**: 309-319, 1986

Gressner, A.M., Wulbrand, U.

Variation of immunocytochemical expression of transforming growth factor (TGF)- β in hepatocytes in culture and liver slices
Cell and Tissue Research **287**: 143-152, 1997

Gross, V., Andus, T., Daig, R., Aschenbrenner, E., Schölmerich, J., Falk, W.

Regulation of interleukin-8 production in a human colon epithelial cell line (HT-29)
Gastroenterology **108**: 653-661, 1995

Hahn, U.

Facts and problems of the intestinal basement membrane
Digestion **46** (Suppl.): 40-48, 1990

Hahn, U., Schuppan, D., Hahn, E.G., Merker, H.-J., Riecken, E.-O.

Intestinal cells produce basement proteins *in vitro*
GUT **28**: 143-151, 1987

Hahn, U., Stallmach, A., Hahn, E.G., Riecken, E.

Basement membrane components are potent promoters of rat intestinal epithelial cell differentiation *in vitro*
Gastroenterology **98**: 322-335, 1990

Hahn, E.G., Wick, G., Pencev, D., Timpl, R.

Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver-collagen type IC, laminin and fibronectin
Gut **21**: 63-71, 1980

Harada, H., Tai, H., Motomura, A., Suzuki, S., Suketa, Y.

Extracellular ATP-induced regulation of epidermal growth factor signaling in cultured renal LLC-PK₁ cells
American Journal of Physiology **264**: C956-C960, 1992

Harper, J.R., Spiro, R.C., Gaarde, W.A., Tamura, R.N., Pierschbacher, M.D., Noble, N.A., Stecker, K.K., Border, W.A.

Role of transforming growth factor β and decorin in controlling fibrosis
In: Cunningham, L.W.: Methods in Enzymology Volume 144: Structural and contractile proteins: 241-254, Academic Press, San Diego, 1994

Höpfner, M., Jansen, A., Lemmer, K., Hanski, C., Glassmeier, G., Riecken, E.-O., Scherübl, H.

Funktionelle Expression P2-purinerge Rezeptoren bei kolorektalen Karzinomen
Zeitschrift für Gastroenterologie **36**: 160, 1998

Housley, R.M., Morris, C.F., Boyle, W., Ring, W., Biltz, R., Tarpley, J.E., Aukerman, S.L., Devine, P.L., Whitehead, R.H., Pierce, G.F.

Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat intestinal tract
Journal of Clinical Investigation **94**: 1764-1777

Hoyle, C.H.V., Knight, G.E., Burnstock, G.

Suramin antagonizes responses to P2-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea pig urinary bladder and taenia coli
British Journal of Pharmacology **99**: 617-621, 1990

Hynes, R.O.

Fibronectins

Springer Verlag, Berlin, 1989

Hynes, R.O.

Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion

Cell **69**: 11-25, 1992

Inoue, C.N., Woo, J.S., Schwiebert, E.M., Morita, T., Hanaoka, K., Guggino, S.E., Guggino, W.B.

Role of purinergic receptors in chloride secretion in Caco-2 cells

American Journal of Physiology **272**: C1862-C1870, 1997

Ish-Horowitz, D., Burke, J.F.

Rapid and efficient cosmid cloning

Nucleic Acid Research **9**: 2989-2998, 1981

Ishii, S., Steele, G., Forn, R., Paliotti, G., Thomas, P., Andrews, C., Hansen, H.J., Goldenberg, D.M., Jessup, J.M.

Normal colonic epithelium adheres to carcinoembryonic antigen and type IV collagen

Gastroenterology **106**: 1242-1250, 1994

Kartha, S., Atkin, B., Martin, T.E., Toback, F.G.

Cytokeratin reorganization induced by adenosine diphosphate in kidney epithelial cells *Experimental Cell*

Research **200**: 219-226, 1992a

Kartha, S., Bradham, D.M., Grotendorst, G.R., Toback, F.G.

Kidney epithelial cells express the c-sis protooncogene and secrete PDGF-like protein

American Journal of Physiology **255**: F800-F806, 1992b

Kartha, S., Sukhatme, V.P., Toback, F.G.

ADP activates protooncogene expression in renal epithelial cells

American Journal of Physiology **252**: F1175-F1179, 1987

Kartha, S., Toback, F.G.

Purine nucleotides stimulate DNA synthesis in kidney epithelial cells in culture

American Journal of Physiology **249**: F967-F971, 1985

Kefalides, N.A., Alper, R., Clark, C.C.

Biochemistry and metabolism of basement membranes

International Reviews of Cytology **61**: 167-228, 1979

Kennedy, C., Burnstock, G.

Evidence for two types of P2-purinoreceptor in the longitudinal muscle of the rabbit portal vein

European Journal of Pharmacology **107**: 161-168, 1985

Kennedy, C., Delbro, D., Burnstock, G.

Evidence for two types of P2-purinoreceptors in the longitudinal muscle of the rabbit port vein

European Journal of Pharmacology **111**: 49-56, 1985

Kimmich, G.A., Randles, J.

An ATP- and Ca²⁺- regulated Na⁺ channel in isolated intestinal epithelial cells

American Journal of Physiology **243**: C116-C123, 1982

Kirsner, J.B., Shorter, R.G.

Recent developments in "nonspecific" inflammatory bowel disease

New England Journal of Medicine **306**: 775-785, 1982

Kleinmann, H.K., Ebihara, I., Killen, P.D., Sasaki, M., Cannon, F.B., Yamada, Y., Martin, G.R.

Genes for basement membrane proteins are coordinately expressed in differentiating F9 cells but not in normal adult murine tissue
Developmental Biology **122**: 373-378, 1987

Koetsier, P.A., Schorr, J., Doerfler, W.

A rapid optimized protocol for downward alkaline southern blotting of DNA
Biotechniques **15**: 259-260, 1993

Koponen, M., Grieder, A., Loor, F.

The effects of cyclosporins on the cell cycle of T-lymphoid cell lines
Experimental Cell Research **140**: 237-250, 1982

Kornblihtt, A.R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., Baralle, F.E.

Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene
EMBO Journal **4**: 1755-1759, 1985

Koyama, S., Podolsky, D.K.

Differential expression of transforming growth factors α and β in rat intestinal epithelial cells
Journal of Clinical Investigation **83**: 1768-1773, 1989

Krauss, G.

Biochemie der Regulation und Signaltransduktion
Wiley-VCH-Verlag, Bayreuth, 1997

Kurokawa, M., Lynch, K., Podolsky, D.K.

Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor β inhibits proliferation and stimulates differentiation
Biochemical and Biophysical Research Communications **142** No 3: 775-782, 1987

Kurpakus, M.A., Stock, E., Jones, J.C.R.

Analysis of wound healing in an *in vitro* model: early appearance of laminin and a 125×10^3 M_r polypeptide during adhesion complex formation
Journal of Cell Science **96**: 651-660, 1990

Lacy, E.R.

Epithelial restitution in the gastrointestinal tract
Journal of Clinical Gastroenterology (Suppl. 1) **10**: 572-577, 1988

Landegren, U.

Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection to lymphokines and cell surface antigens
Journal of Immunological Methods **67**: 379-388, 1984

Laurie, G.W., Leblond, C.P., Martin, G.R.

Localization of type IV collagen, laminin heparan sulfates proteoglycan and fibronectin to the basal lamina of basement membranes
Journal of Cell Biology **95**: 340-344, 1982

Lawrence, D.A., Pircher, R., Jullien, P.

Conversion of high molecular weight latent TGF β under acidic conditions
Biochemical and Biophysical Research Communications **113**: 1026-1034, 1985

Leff, P., Wood, B.E., O'Connor, S.E.

Suramin is a slowly-equilibrating but competitive antagonist at P2x receptors in the rabbit isolated ear artery

British Journal of Pharmacology **101**: 645-649, 1990

Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R.A., Buell, G., Suprenatn, A.

Coexpression of P2x2 and P2x3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons

Nature **377**: 432-435, 1995

Li, R.-K., Li, G., Mickle, D.A.G., Weisel, R.D., Merante, F., Luss, H., Rao, V., Christakis, G.T., Williams, W.G.

Overexpression of transforming growth factor- β 1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy.

Circulation **96** No 3: 874-881, 1997

Lin, M.-L., Bertics, P.J.

Laminin responsiveness is associated with changes in fibroblast morphology, motility, and anchorage-independent growth: cell system for examining the interaction between laminin and EGF signaling pathways

Journal of Cellular Physiology **164**: 593-604, 1995

Lipkin, M.

Proliferation and differentiation of normal and diseased gastrointestinal cells.

In: **Johnson, L.R.**: Physiology of the gastrointestinal tract

ROLEI Press New York, 1987

Lipkin, M., Sherlock, P., Bell, B.

Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man II. Cell renewal in stomach, ileum, colon, rectum

Gastroenterology **45**: 721-732, 1963

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J.

Molekulare Zellbiologie

de Gruyter-Verlag, 2. Auflage, Berlin/New York, 1996

Lustig, K.D., Shiau, A.K., Brake, A.J., Julius, D.

Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells

Proceedings of the National Academy of Sciences **90**: 5113-5117, 1993

Lyons, R.M., Gentry, L.E., Purchio, A.F., Moses, H.L.

Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin

Journal of Cell Biology **110**: 1361-1367, 1990

Madara, J.L., Stafford, J.

Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayer

Journal of Clinical Investigation **83**: 724-727, 1989

Madri, J.A., Pratt, B.M., Yannariello-Brown, J.

Matrix-driven cell size change modulates aortic endothelial cell proliferation and sheet migration

American Journal of Pathology **132**: 18-27, 1988

Malam-Souley, R., Campan, M., Gadeau, A.-P., Desgranges, C.

Exogenous ATP induces a limited cell cycle progression of arterial smooth muscle cells

American Journal of Physiology **264**: C783-C788, 1993

Martinson, J., Muren, A.

Excitatory and inhibitory effects of vagus stimulation on gastric motility in the cat

Acta Physiologica Scandinavica **57**: 309-316, 1963

Massagué, J.

The transforming growth factor- β family
Annual Reviews in Cell Biology **6**: 597-641, 1990

McCormack, S.A., Viar, M.J., Johnson, L.R.

Migration of IEC-6 cells: a model for mucosal healing
American Journal of Physiology **263**: G426-G435, 1992

McNeil, P.L., Ito, S.

Gastrointestinal cell plasma membrane woundig and resealing *in vivo*
Gastroenterology **96**: 1238-1248, 1989

Mikami, H., Watanabe, S., Hirose, M., Sato, N.

Role of extracellular matrix in wound repair by cultured gastic mucosal cell
Biochemical and Biophysical Research Communications **202**: 285-292, 1994

Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K., Yamada, K.M.

Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules
Journal of Cell Biology **131**: 791-805, 1995

Moore, R., Carlson, S., Madara, J.L.

Rapid barrier restitution in an *in vitro* model of intestinal epithelial injury
Laboratory Investigation **60**: 237-244, 1989

Moore, R., Madara, J.L., MacLeod, R.J.

Enterocytes adhere preferentially to collagen IV in a differentially regulated divalent cation-dependent manner
American Journal of Physiology **266**: G1099-G1107, 1994

Moore, R., Madri, J., Carlson, S., Madara, J.L.

Collagens facilitate epithelial migration in restitution of native guinea pig intestinal epithelium
Gastroenterology **102**: 119-130, 1992

Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., Heldin, C.-H.

A role of the latent TGF- β 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF- β 1
EMBO Journal **10**: 1091-1191, 1991

Mustoe, T.A., Pierce, G.F., Morishima, C., Deuel, T.F.

Growth-factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model
Journal of Clinical Investigation **87**: 694-703, 1991

Nakajima, Y., Miyazono, K., Kato, M., Takasa, M., Yamagishi, T.

Extracellular fibrillar structure of latent TGF β binding protein-1: Role in TGF β -dependent endothelial-mesenchymal transformation during endocardial cushion tissue formation in mouse embryonic heart
Journal of Cell Biology **136**: 193-204, 1997

Nathan, C., Sporn, M.

Cytokines in context
Journal of Cell Biology **113**: 981-986, 1991

Neary, J.T.

Trophic actions of extracellular ATP on astrocytes, synergistic interactions with fibroblast growth factors and underlying signal transduction mechanism

In: **Chadwick, D.J., Goode, J.A.**

P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms

John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, Ciba Foundation, 1996: 130-138

Neary, J.T., Norendberg, M.D.

- Signalling by extracellular ATP: physiological and pathological considerations in neuronal-astrocytic interactions
Progress in Brain Research **94**: 145-151, 1992
- Neary, J.T., Rathbone, M.P., Cattabeni, F., Burnstock, G.**
 Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells
Trends in neurosciences **19**: 13-18, 1996
- Neary, J.T., Whittemore, S.R., Zhu, Q., Norenberg, M.D.**
 Synergistic activation of DNA sythesis in astrocytes by fibroblast growth factor and extracellular ATP
Journal of Neurochemistry **63**: 490-494, 1994
- Nishida, T., Nagakawa, S., Awata, T., Ohashi, Y., Watanabe, K., Manabe, R.**
 Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea *in situ*
Journal of Cell Biology **97**: 1653-1657, 1983
- Nusrat, A., Delp, C., Madara, J.L.**
 Intestinal epithelial restitution characterization of a cell culture model and mapping of cytoskeletal elements in migrating cells
Journal of Clinical Investigation **89**: 1501-1511, 1992
- Oberbäumer, I., Laurent, M., Schwarz, U., Sakurai, Y., Yamada, Y., Vogeli, G., Voss, T., Siebold, B., Glanville, R.W., Kühn, K.**
 Amino acid sequence of the non collagenous globular domain (NC1) of the $\alpha 1(IV)$ chain of basement membrane collagen as derived from complemetary DNA
European Journal of Biochemistry **147**: 217-224, 1985
- O'Connor, S.E., Dainty, I.A., Leff, P.**
 Further succlassification of ATP receptors based on agonist studies
Trends in Pharmacological Sciences **12**: 137-141, 1991
- O'Keefe, E.J., Payne, R.E., Russell, N., Woodley, D.T.**
 Spreading and enhanced motility of human keratinocytes on fibronectin
Journal of Investigative Dermatology **85**: 125-130, 1985
- Olson, A.D., Pysher, T., Bienkowski, R.S.**
 Organization of intestinal epithelial cells into multicellular structures requires laminin and functional microfilaments
Experimental Cell Research **192**: 543-549, 1991
- Paimela, H., Goddard, P.J., Carter, K., Khakee, R., McNeil, P.L., Ito, S., Silen, W.**
 Restitution of frog gastric mucosa *in vitro*: effect of basic fibroblast growth factor
Gastroenterology **104**: 1337-1345, 1993
- Paller, M.S., Schnaith, E.J., Rosenberg, M.E.**
 Purinergic receptors mediate cell proliferation and enhanced recovery from renal ischemia by adenosine triphosphate
Journal of Labatory and Clinical Medicine **131**: 174-183, 1998
- Pierschbacher, M.D., Ruoslathi, E.**
 Cell attachment activity of fibronectin can be duplicates by small synthetic fragments of the molecule
Nature **309**: 30-33, 1984
- Pikkarainen, T., Eddy, R., Fukushima, Y., Byers, M., Shows, T., Pihlajaniemi, T., Saraste, M., Tryggvason, K.**
 Human laminin B1 chain
The Journal of Biological Chemistry **262**: 10454-10462, 1987
- Pintor, J., Miras-Portugal, M.T.**

Diadenosine polyphosphates (ApxA) as new neurotransmitters
Drug Developmental Research **28**: 259-262, 1993

Pircher, R., Jullien, P., Lawrence, D.A.

β -transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex

Biochemical and Biophysical Research Communications **136**: 30-37, 1986

Podolsky, D.K.

The epithelium in IBD - two faces: barrier and immune frontier

In: **Tytgat, G.N.J., Barteslmann, J.F.W.M., van Denter, S.J.H.**: Inflammatory bowel diseases

Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1995: 357-359

Podolsky, D.K., Kindon, H., Lynch-Devaney, K., Dignass, A., Babyatsky, M.

Epithelium in inflammatory bowel disease: trefoil peptides at the interface.

In: **Tytgat, G.N.J., Barteslmann, J.F.W.M., van Denter, S.J.H.**: Inflammatory bowel diseases

Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1995: 360-365

Podolsky, D.K., Weiser, M.M.

Specific selection of mitotically active intestinal cells by Concanavalin A-derivatized fibers

The Journal of Cell Biology **58**: 497-500, 1973

Potten, C.S., Kellet, M., Roberts, S.A., Rew, D.A., Wilson, G.D.

Measurement of *in vivo* proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine

Gut **33**: 71-78, 1992

Powell, D.W.

Barrier function of epithelia

American Journal of Physiology **241**: G275-G288, 1981

Pratt, B.M., Harris, A.S., Morrow, J.S., Madri, J.A.

Mechanism of cytoskeletal regulation: modulation of aortic endothelial cell spectrin by the extracellular matrix.

American Journal of Pathology **117**: 349-354, 1984

Quaroni, A., Isselbacher, K.J., Ruoslahti, E.

Fibronectin synthesis by epithelial crypt cells of rat small intestine

Proceedings of the National Academy of Sciences **75**: 5548-5552, 1978

Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.T., Isselbacher, K.J.

Epitheloid cell cultures from rat small intestine

Journal of Cell Biology **80**: 248-265, 1979

Rao, Z., Handford, P., Mayhew, M., Knott, V., Brownlee, G.G., Stuart, D.

The structure of Ca^{2+} -binding epidermal growth factor-like domain: its role in protein-protein interactions

Cell **82**: 131-141, 1995

Rapaport, E., Fontaine, J.

Anticancer activities of adenine nucleotides in mice are mediated through expansion of erythrocyte ATP pools

Proceedings of the National Academy of Science **86**: 1662-1666, 1989

Rathborne, M.P., Middlemiss, P.J., Kim, J.-L.

Adenosine and its nucleotides stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells

Neuroscience Research **13**: 1-17, 1992

Reinecker, H.-C., Macdermott, R.P., Mirau, S., Dignass, A., Podolsky, D.K.

Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15
Gastroenterology **111**: 1706-1713, 1996

Roberts, A.B., Sporn, M.B.

The transforming growth factor- β s

In: **Sporn, M.B., Roberts, A.B.**: Peptide growth factors and their receptors I

Springer Verlag, New York, 1991: 417-472

Rubin, K., Johansson, S., Pettersson, I., Ocklind, C., Öbrink, B., Höök, M.

Attachement of rat hepatocytes to collagen and fibronectin; a study using antibodies against cell surface components

Biochemical and Biophysical Research Communications **91**: 86-94, 1979

Ruoslahti, E.

Integrins

Journal of Clinical Investigation: **87**: 1-5, 1991

Russell, W.C., Newman, C., Williamson, D. H.

A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses

Nature **253**: 461-462, 1975

Rutten, M.J., Ito, S.

Morphology and electrophysiology of guinea pig gastric mucosal repair *in vitro*

American Journal of Physiology **244**: G171-G182, 1983

Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F.

Molecular cloning. A laboratory manual

Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1989

Santoro, S.A., Zutter, M.M., Wu, J.E., Staatz, W.D., Saelmann, E.U.M., Keely, P.J.

Analysis of collagen receptors

In: **Cunnigham, L.W.**: *Methods in Enzymology Volume 144: Structural and contractile proteins*: 147-183, Academic Press, San Diego, 1994

Santos, M.F., McCormack, S.A., Guo, Z., Okolicancy, J., Zheng, Y., Johnson, L.R., Tigyi, G.

Rho protein play a critical role in cell migration during the early phase of mucosal restitution

Journal of Clinical Investigation **100**: S216-225, 1997a

Santos, M.F., Viar, M.J., McCormack, S.A., Johnson, L.R.

Polyamines are important for attachment of IEC-6 cells to extracellular matrix

American Journal of Physiology **273**: G175-G183, 1997b

Sarret, Y., Stamm, C., Jullien, D., Schmitt, D.

Keratinocyte migration is partially supported by the cell-binding domain of fibronectin and is RGDS-dependent

Journal of Investigative Dermatology **99**: 656-659, 1992

Sasaki, M., Kleinmann, H.K., Huber, H., Deutzmann, R., Yamada, Y.

Laminin, a multidomain protein

Journal of Biological Chemistry **263**: 16536-16544, 1988

Sato, Y., Rifkin, D.P.

Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of latent transforming growth factor β_1 like molecules by plasmin during coculture

Journal of Cell Biology **109**: 309-315, 1989

Schreiner, C., Bauer, J., Margolis, M., Juliano, R.L.

Expression and role of integrins in adhesion of human colonic carcinoma cells to extracellular matrix components

Clinical Experimental Metastasis **9**: 163-178, 1991

Schuppan, D., Riecken, E.O.

Molecules of the extracellular matrix: potential role of collagens and glycoproteins in intestinal adaptation

Digestion **46** (Suppl.): 2-11, 1990

Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H., Ohashi, Y.

Tabacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways

Science **270**: 1988-1992, 1995

Shirota, J., LeDug, L., Yuan, S.

Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells

Virchows Archiv **58**: 303-308, 1990

Siegel, N.J., Avison, M.J., Reilly, H.F., Alger, J.R., Shulman, R.G.

Enhanced recovery of renal ATP with postischemic infusion of ATP-MgCl₂ determined by ³¹P-NMR

American Journal of Physiology **245**: F530-F534, 1983

Silen, W.

Gastric mucosal defense and repair

In: **Johnson, L.R.**: Physiology of the gastrointestinal tract

Raven Press, New York; 1987: 1044-1069

Simmons, J.G., Hoyt, E.C., Westwick, J.K., Brenner, D.A., Pucilowska, J.B., Lund, P.K.

Insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor interact to regulate growth and gene expression in IEC-6 intestinal epithelial cells

Molecular Endocrinology **9**: 1157-1165, 1995

Simo, S., Simon-Assmann, P., Bouziges, F., Leberquier, C., Keding, M., Ekblom, P., Sorokin, L.

Changes in the expression of laminin during development

Development **112**: 477-487, 1991

Simon-Assmann, P., Bouziges, F., Freund, J.N., Perrin-Schmitt, F., Keding, M.

Type IV collagen mRNA accumulates in the mesenchymal compartment at early stages of murine developing intestine

Journal of Cell Biology **110**: 849-857, 1990a

Simon-Assmann, P., Simo, P., Bouziges, F., Haffen, K., Keding, M.

Synthesis of basement membrane proteins in the small intestine

Digestion **46** (Suppl.): 12-21, 1990b

Sindern, E., Schweppe, K., Ossege, L.M., Malin, J.P.

Potential role of transforming growth factor- β 1 in terminating the immun response in patients with Guillain-Barré syndrome

Journal of Neurology **243**: 264-268, 1996

Soto, F., Garcia-Guzman, M., Gomez-Hernandez, J.M., Hollmann, M., Karschin, I. C., Stühmer, W.

P2x4: An ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain

Proceedings of the National Academy of Sciences **93**: 3684-3688, 1996

Sponsel, H.T., Breckon, R., Anderson, R.J.

Adenine nucleotides and protein kinase C regulation of renal tubular epithelial cell wound healing

Kidney International **48**: 85-92, 1995

Sporn, M.B., Roberts, A.B.

Peptide growth factors and their receptors I and II
 Springer Verlag, New York, 1991

Sporn, M.B., Roberts, A.B.

Transforming growth factor- β : recent progress and new challenges
Journal of Cell Biology **119**: 1017-1021, 1992

Spranzi, E., Djeu, J.Y., Hoffmann, S.L., Eppling-Burnette, P.K., Blanchard, D.K.

Lysis of human monocytic leukaemia cells by extracellular adenosine triphosphate: mechanism and characterization of the adenosine triphosphate receptor
Blood **82**: 1578-1585, 1993

Streuli, C.H., Schmidhauser, C., Kobrin, M., Bissell, M.J., Derynck, R.

Extracellular matrix regulates expression of the TGF- β 1 gene
Journal of Cell Biology **120**: 253-260, 1993

Stutts, M.J., Lazarowski, E.R., Paradiso, A.M., Boucher, R.C.

Activation of CFTR Cl⁻ conductance in polarized T84 cells by luminal extracellular ATP
American Journal of Physiology **268**: C425-C433, 1995

Sud'ina, G.F., Mirzoeva, O.K., Galkina, S., Pushkareva, M., Ullrich, V.

Involvement of ecto-ATPase and extracellular ATP in polymorphonuclear granulocyte-endothelial interactions
FEBS Letters **423**: 243-248, 1998

Suemori, S., Ciacci, C., Podolsky, D.K.

Regulation of transforming growth factor expression in rat intestinal epithelial cell lines
Journal of Clinical Investigation **87**: 2216-2221, 1991

Suh, E., Traber, P.G.

An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation
Molecular and Cellular Biology **16**: 619-625, 1996

Sumpio, B.E., Chaudry, I.H., Clemens, M.G.

Accelerated functional recovery of isolated rat kidney with ATP-MgCl₂ after warm ischemia
American Journal of Physiology **247**: R1047-R1053, 1984

Suprenant, A.

Functional properties of native and cloned P2x receptors

In: **Chadwick, D.J., Goode, J.A.**

P2 purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms

John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, Ciba Foundation, 1996: 208-218

Tada, H., Kuroshiman, K., Koyama, M.

An improved colorimetric assay for interleukin-2
Journal of Immunological Methods **93**: 157-165, 1986

Takacs, L., Kovacs, E.J., Smith, M.R., Young, H.A., Durum, S.K.

Detection of Il-1 α and Il-1 β gene expression by *in situ* hybridization. Tissue localization of Il-2 mRNA in the normal C57BLB/6 mouse
Journal of Immunology **141**: 3081-3095, 1988

Takahashi, M., Ota, S., Shimada, T., Hamada, E., Kawabe, T., Okudaira, T., Matsumura, M., Kaneko, N., Terano, A., Nakamura, T., Omata, M.

Hepatocyte growth factor is the most potent endogenous stimulant of rabbit gastric epithelial cell proliferation and migration in primary culture

Journal of Clinical Investigation **95**: 1994-2003, 1995

Talts, J.F., Mann, K., Yamada, Y., Timpl, R.

Structural analysis and proteolytic processing of recombinant G domain of mouse laminin $\alpha 2$ chain
FEBS Letters **426**: 71-76, 1998

Tamkun, J.W., Schwarzbauer, J.E., Hynes, R.O.

A single rat fibronectin gene generates three different mRNAs by alternative splicing of a complex exon
Proceedings of the National Academy of Sciences **81**: 5140-5144, 1984

Terranova, V.P., Rohrbach, D.H., Martin, G.R.

Role for laminin in the attachment of PAM 212 (Epithelial) cells to basement membrane collagen
Cell **22**: 719-726, 1980

Timpl, R.

Structure and biological activity of basement membrane proteins
European Journal of Biochemistry **189**: 487-502, 1989

Timpl, R., Brown, J.C.

The Laminins
Matrix Biology **14**: 275-281, 1994

Timpl, R., Dziadek, M., Fujiwara, S., Nowack, S., Wick, G.

Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein
European Journal of Biochemistry **137**: 455-465, 1983

Toback, F.G.

Regeneration after acute tubular necrosis
Kidney International **41**: 226-246, 1992

Trier, J.S., Allan, C.H., Abrahamson, D.R., Hagen, S.J.

Epithelial basement membrane of mouse jejunum
Journal of Clinical Investigation **86**: 87-95, 1990

Tso, J.Y., Sun, X.-H., Kao, T.-H., Reece, K.S., Wu, R.

Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene
Nucleic Acid Research **13**, No 7: 2485-2502, 1985

Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Suprenant, A., Buell, G.

A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP
Nature **371**: 516-519, 1994

Vareli, M., Ghahary, A., Scott, P.G., Tredget, E.E.

Cytoskeleton regulates expression of genes for transforming growth factor- $\beta 1$ and extracellular matrix proteins in dermal fibroblasts
Journal of Cellular Physiology **172**: 192-199, 1997

Vracko, R.

Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure
American Journal of Pathology **77**: 314-337, 1974

Wakefield, L.M., Smith, D.M., Flander, K.C., Sporn, M.B.

Latent transforming growth factor- β from human platelets: a high molecular weight complex containing precursor sequences
Journal of Biological Chemistry **263**: 7646-7654, 1988

Wang, D., Huang, N.-N., Heppel, L.A.

Extracellular ATP shows synergistic enhancement of DNA synthesis when combined with agents that are active in wound healing or as neurotransmitter

Biochemical and Biophysical Research Communications **166** No 1: 251-258, 1990

Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B.F., Burnstock, G., Barnard, E.A.

Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor

FEBS Letters **324**: 219-225, 1993

Werb, Z., Tremble, P.M., Behrendtsen, O., Crowley, E., Damsky, C.H.

Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression

Journal of Cell Biology **109**: 877-889, 1989

Weiser, M.M.

Concanavalin A agglutination of intestinal cells from human fetus

The Journal of Biological Chemistry **248**: 2536-2541, 1973

Weiser, M.M., Sykes, D.E., Killen, P.D.

Rat intestinal basement membrane synthesis

Laboratory Investigation **62**: S325-330, 1990

Williams, M.

Purine receptors in mammalian tissues: pharmacology and functional significance

Annual Reviews of Toxicology **27**: 315-345, 1987

Wolpert, S.I., Wong, M.-L.D., Wang, J.-Y., Bass, B.L.

Epithelial-matrix interactions: laminin downregulates enterocyte EGF Receptor and IGF-I Receptor expression

Journal of Surgical Research **63**: 345-348, 1996b

Wood, L., Theriault, N., Vogeli, G.

cDNA clones completing the nucleotide and derived amino acid sequence of the alpha 1 chain of basement membrane (type IV) collagen from mouse

FEBS Letters **227**: 5-8, 1988

Wu, S.G., Miyamoto, T.

Radioprotection of the intestinal crypts of mice by recombinant human interleukin-1 alpha

Radiation Research **123**: 112-115, 1988

Wyllie, A.H.

Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation

Nature **284**: 555-556, 1980

Yang, J.-J., Krauss, R.S.

Extracellular ATP induces anchorage-independent expression of cyclin A and rescues the transformed phenotype of a Ras-resistant mutant cell line

Journal of Biological Chemistry **272**: 3103-3108, 1997

You, J., Johnoson, T.D., Childres, W.F., Bryan, R.M. jr.

Endothelial-mediated dilations of rat middle cerebral arteries by ATP and ADP

American Journal of Physiology **273**: H1472-H1477, 1997

Yurchenco, P.D., Schittny, J.C.

Molecular architecture of basement membranes

FASEB Journal **4**: 1577-1590, 1990

Zheng, L.-M., Zychlinsky, A., Liu, C.-C., Ojcius, D.M., Young, J. D.-E.

Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death

Journal of Cell Biology **112**: 279-288, 1991

Zoetewij, J.P., Van-de-Water, B., De-Bond, H.J., Mulder, G.J., Nagelkerke, J.F.

Involvement of intracellular Ca^{2+} and K^{+} in dissipation of the mitochondrial membrane potential and cell death induced by extracellular ATP in hepatocytes

Biochemistry Journal **288**: 207-213, 1992

8 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. H. Goebell, emeritierter Direktor der Abteilung für Gastroenterologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Essen, möchte ich herzlich für die Möglichkeit danken, die vorliegende Doktorarbeit im Institut für Gastroenterologie anzufertigen und für seine Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Axel Dignaß, Medizinische Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Universitätsklinikum Charité-Campus, Virchowklinikum Berlin, gilt mein besonderer Dank für seine hervorragende Betreuung, seine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die zahlreichen wertvollen Anregungen und die gründliche Durchsicht des Manuskripts.

Frau Dipl. Biol. Sabine Bein, Frau Sandra Spiegler und Frau Jessica Mazurkiewicz, Abteilung für Gastroenterologie, Universitätsklinikum Essen, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit.

Frau Dipl. Biol. Nora Riley, Abteilung für Gastroenterologie, Universitätsklinikum Essen, möchte ich für viele wertvolle Anregungen bei der Durchführung molekularbiologischer Arbeitstechniken danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Andreas Kribben, Frau Dipl. Biol. Bettina Lange und Frau Simone Jacobi, Abteilung für Nieren- und Hochdruckkranke, Universitätsklinikum Essen, danke ich für die Möglichkeit die MAP-Kinase Messungen im Nephrologischen Labor des Universitätsklinikums Essen durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern für ihre Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

9 Veröffentlichungen

Veröffentlichungen zum Thema der vorliegenden Arbeit:

Dignass, A.U., **Becker, A.**, Spiegler, S., Goebell, H.
Adenine nucleotides modulate epithelial wound healing *in vitro*
European Journal of Clinical Investigation **28**: 554-561, 1998

Sonstige Veröffentlichungen:

Cario, E., **Becker, A.**, Goebell, H., Dignass, A.U.
Factor XIII modulates intestinal epithelial cell growth and migration *in vitro*
Scandinavian Journal of Gastroenterology, *in press*

Dignass, A.U., Sturm, A., **Becker, A.**, Hotz, A., Goebell, H.
Interferon- γ modulates intestinal epithelial cell function *in vitro* through a TGF β -independent pathway
Zeitschrift für Gastroenterologie **36** (Suppl. 1): 50-57, 1998

Sturm, A., **Becker, A.**, Schulte, K.-M., Goebell, H., Dignass, A.U.
Lysophosphatidic acid modulates intestinal epithelial cell function *in vitro*
Annals of the New York Academy of Sciences **859**: 223-226, 1998

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Becker
Vorname:	Andrea
Geburtsdatum:	11. Mai 1966
Geburtsort:	Essen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

1972 - 1976	Fichteschule in Bottrop
1976 - 1985	Heinrich-Heine-Gymnasium Bottrop
Juli 1985	Abitur

Studium

1985 - 1985	Studium der Rechtswissenschaften an der Ruhruniversität Bochum
1986 - 1987	Studium der Biologie und Chemie Lehramt Sekundarstufe I und II Universität/Gesamthochschule Essen
1987 - 1994	Studium der Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Abschluß: Diplom-Biologin
1994 - 1998	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Abteilung für Gastroenterologie Universitätsklinikum Essen
1995 - 1999	Anfertigung der Promotion Abteilung für Gastroenterologie Universitätsklinikum Essen